

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



TESIS DOCTORAL

**Papel del eje MDK/ALK en células iniciadoras del glioma:
implicaciones terapéuticas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Israel López Valero

Directores

Guillermo Velasco Díez
María del Mar Lorente Pérez

Madrid
Ed. electrónica 2019

TESIS DOCTORAL

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



PAPEL DEL EJE MDK/ALK EN CÉLULAS INICIADORAS DE GLIOMA: IMPLICACIONES TERAPÉUTICAS

ISRAEL LÓPEZ VALERO

Directores de la Tesis Doctoral

Dr. Guillermo Velasco Díez

Dra. María del Mar Lorente Pérez

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer esta Tesis a las 2 personas que me brindaron la oportunidad de entrar en este laboratorio. Guille, muchas gracias por confiar siempre en mí, por apoyarme, por guiarme y a la vez darme la libertad científica y personal para que hiciera lo que considerara mejor en cada caso. Y a ti Manolo por tener la puerta del despacho siempre abierta y darme esos pequeños consejos tan valiosos.

Muchas gracias, Mar, porque tú me enseñaste todo cuando llegué y porque durante todo este largo camino has sido la respuesta a mis dudas científicas y una fuente de optimismo en el día a día. Igualmente he de decir que esta Tesis no hubiera sido posible sin el trabajo duro y diario, durante muchos años y en etapas muy diferentes, de las personas que han trabajado codo con codo conmigo de una forma más directa: David, gracias por remar juntos en este proyecto, por esos *in vivos* interminables y esos congresos por el mundo; a ti Né por ser la joyita de la corona, haces que el tiempo se estire para producir más resultados; a ti Pepe por poner tanto esfuerzo, meter tantas horas y tener las cosas tan claras, y a ti Esti por interesarte en mi proyecto y saber casi más de él que yo mismo.

Y por supuesto, a los miembros del L1, L2, L7, zulo y cualquier otro habitáculo que hayáis pisado. Gracias por hacer del compañerismo la seña de identidad de este grupo...si uno ha de imaginarse cuál es la mejor atmósfera en la que pasar un tiempo nada desdeñable de la existencia, la que vosotros habéis generado ha superado con creces lo que yo buscaba.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	5
ABSTRACT	7
ABREVIATURAS	9
INTRODUCCIÓN	15
1. Gliomas	17
1.1 Descripción y clasificación de los tumores del sistema nervioso central	17
1.2 Glioblastoma (GBM)	17
1.3 Origen de los gliomas. Células iniciadoras de tumores.....	23
1.4 Modelos animales de glioma	28
2. Cannabinoides	33
2.1 Señalización intracelular dependiente de CB ₁ y CB ₂	34
2.2 Papel del sistema endocannabinoide	35
2.3 Papel de los cannabinoides en cáncer:	36
2.4 Aplicaciones terapéuticas (fármacos cannabinoides).....	41
3. MIDQUINA (MDK)	43
3.1 Descripción general. Estructura y regulación.....	43
3.2 Regulación de la expresión génica de <i>MDK</i> y estructura proteica.....	43
3.3 Funciones de la MDK.....	45
3.4 Posibles aplicaciones terapéuticas.....	46
3.5 Señalización celular dependiente de MDK.....	46
4. ALK.....	49
4. 1 Descripción general. Expresión génica y estructura proteica.....	49
4.2 Señalización intracelular dependiente de ALK	50
4.3 Papel de ALK en cáncer	50
4.4 ALK como diana terapéutica	52
5. Autofagia.....	53
5.1 Desarrollo de la macroautofagia. Etapas del proceso autofágico	53
5.2 Papel dual de la autofagia en cáncer.....	55
OBJETIVOS	59
MATERIALES Y MÉTODOS	63
1. Reactivos.....	65
1.1 Moléculas moduladoras del eje MDK/ALK	65

1.2 Cannabinoides	65
1.3 Otros compuestos	65
2. Cultivos celulares.....	65
2.1 Determinación de la capacidad de crecimiento de esferas en condiciones no clonales/Determinación del número total de células en cultivos de GICs.....	67
2.2 Determinación de la capacidad de auto-renovación de GICs (ensayos de LDA)	67
3. Detección de los niveles de MDK	68
4. Western blot	68
5. PCR cuantitativa (qPCR)	70
6. Inmunofluorescencia y microscopía.....	71
7. Transducción con partículas lentivirales	71
7.1 Generación de las partículas lentivirales	71
7.2 Transducción de cultivos de GICs con partículas lentivirales	72
8. Modelos animales.....	73
8.1 Modelo transgénico <i>Nestina-Tva</i>	73
8.2 Generación de tumores subcutáneos e intracraneales.....	76
9. Nucleofección con plásmidos	78
10. Inmunofluorescencia de tumores y TUNEL.....	78
11. Ensayos de viabilidad celular	79
12. Inmunoprecipitación.....	79
13. Análisis molecular de los cultivos de GICs	80
14. Análisis de bases de datos de pacientes y análisis bioinformático	80
15. Citometría de flujo.....	81
16. Estadística.....	81
RESULTADOS.....	83
- Objetivo 1: Optimización de la terapia antitumoral frente al GBM basada en el uso de cannabinoides.....	85
1.1 La administración de THC y CBD en combinación con TMZ reduce el crecimiento de tumores intracraneales generados con células U87	85
1.2 El tratamiento con preparaciones cannabinoides que poseen una mayor proporción de CBD que de THC muestra un marcado efecto antitumoral	87
1.3 Efecto de los cannabinoides en cultivos enriquecidos en GICs.....	87
1.4 Los cultivos de GICs poseen una elevada sensibilidad a la acción de extractos cannabinoides que poseen una mayor proporción de CBD que de THC	90
1.5 La combinación de THC y CBD (1:5) + TMZ posee un efecto antitumoral más potente que la combinación de THC y CBD (1:1) + TMZ.....	92

- Objetivo 2: Análisis del papel del eje MDK/ALK en la regulación de la auto-renovación y la capacidad tumorigénica de las GICs.....	97
2.1 Los niveles elevados de MDK se correlacionan con un peor pronóstico en pacientes con glioma.....	97
2.2 La MDK regula la capacidad de auto-renovación y formación de esferas en GICs	97
2.3 La MDK desempeña un papel relevante en la gliomagénesis.....	103
2.4 La MDK regula las propiedades <i>stem-like</i> de las GICs mediante la estimulación del receptor ALK.....	106
- Objetivo 3: Análisis del mecanismo de acción del eje MDK/ALK en GICs.	115
3.1 La regulación del factor de transcripción SOX9 es una etapa clave para la pérdida de las características <i>stem-like</i> inducida por el bloqueo del eje MDK/ALK.....	115
3.2 El descenso en los niveles de SOX9 tras el bloqueo del eje MDK/ALK no es dependiente de mecanismos transcripcionales o degradación proteasomal.....	116
3.3 El bloqueo del eje MDK/ALK activa la autofagia en GICs.....	119
3.4 La estimulación de la autofagia es necesaria para la pérdida de las propiedades <i>stem-like</i> inducida por el bloqueo del eje MDK/ALK.....	121
3.5 La inhibición del eje MDK/ALK induce la degradación autofágica de SOX9 en GICs	121
- Objetivo 4: Análisis de la eficacia terapéutica del tratamiento con inhibidores del eje MDK/ALK individualmente o en combinación con otros agentes antitumorales en modelos preclínicos de GBM.....	127
4.1 La inhibición farmacológica del receptor ALK reduce el crecimiento de tumores subcutáneos generados con GICs	127
4.2 La combinación de inhibidores del eje MDK/ALK y otros agentes antitumorales elimina la población de GICs <i>in vitro</i>	127
4.3 La combinación de inhibidores del eje MDK/ALK con cannabinoides o TMZ posee un potente efecto antitumoral en tumores derivados de GICs.....	138
DISCUSIÓN	147
CONCLUSIONES	167
REFERENCIAS	171
ANEXO I: ESTADÍSTICA LDA	209
ANEXO II: PUBLICACIONES	213

RESUMEN

El glioblastoma multiforme (GBM) es una de las formas más agresivas de cáncer. Estos tumores se caracterizan por presentar una alta resistencia a los tratamientos quimio y radioterapéuticos utilizados actualmente. Se ha propuesto que este hecho podría deberse, al menos en parte, a la presencia dentro de estos tumores de una subpoblación minoritaria de células denominadas células iniciadoras de glioma o GICs (utilizando su acrónimo en inglés *Glioma Initiating Cells*) y que podrían ser responsables de las recidivas características de estos tumores.

De esta manera, la determinación de los factores de crecimiento y las vías de señalización implicadas en la auto-renovación y las propiedades tumorigénicas es esencial para diseñar nuevas estrategias dirigidas de una forma más específica frente a esta población celular. Estudios previos han demostrado que el factor neurotrófico MIDQUINA (MDK) se asocia con un mal pronóstico en pacientes con GBM, con lo que en la presente Tesis Doctoral nos preguntamos si la MDK podría participar en la regulación de la biología de las GICs.

Nuestros resultados muestran que la MDK estimula la capacidad de auto-renovación, así como la generación de tumores derivados de cultivos enriquecidos en GICs obtenidos a partir de muestras de pacientes con GBM, mediante la estimulación del receptor del linfoma anaplásico ALK (del acrónimo en inglés *Anaplastic Lymphoma Kinase*). Esta acción es dependiente, al menos en parte, de la regulación de la estabilidad del factor de transcripción SOX9, cuya expresión se ha asociado a una menor supervivencia en pacientes con GBM, así como con el estado indiferenciado de células iniciadoras de este tipo de tumores. Así, la inhibición genética o farmacológica del eje MDK/ALK induce la degradación de SOX9 a través de la vía autofagia-lisosoma en cultivos de GICs, lo que constituye un evento temprano esencial para la pérdida de las propiedades tumorigénicas y de auto-renovación que caracterizan a estas células.

En este trabajo encontramos también que el uso de fármacos capaces de bloquear el eje MDK/ALK en combinación con otros agentes antitumorales como la temozolomida (TMZ, el agente quimioterapéutico utilizado actualmente para el tratamiento del GBM) o con los cannabinoides (una familia de compuestos naturales capaces de inhibir el crecimiento de diferentes tipos de tumores, incluidos los gliomas) elimina la población de GICs y tiene una potente actividad antitumoral en modelos preclínicos de esta enfermedad. Además, estos resultados indican que el tratamiento con extractos cannabinoides que poseen distintas proporciones de THC (Δ^9 -tetrahidrocannabinol) o de CBD (cannabidiol), 2 de los principales compuestos producidos por la planta *Cannabis sativa*, potencian la acción antitumoral ejercida por la TMZ sobre tumores derivados de cultivos enriquecidos en GICs.

En conjunto, los resultados de esta Tesis Doctoral ponen de relieve la importancia del eje MDK/ALK/SOX9 en GICs y propone nuevos abordajes terapéuticos que pueden contribuir a combatir el GBM.

ABSTRACT

Glioblastoma multiforme (GBM) is one of the most aggressive forms of cancer. It has been proposed that the presence within these tumors of a population of cells with stem-like features termed Glioma stem-like cells or Glioma Initiating Cells (GICs) exhibiting a high resistance to chemo and radiotherapy is responsible for the relapses that almost invariably take place in the patients with this disease.

Therefore, the identification of the growth factors and signalling pathways involved in the regulation of the self-renewal and tumorigenic properties of these cells is essential to design new therapeutic strategies aimed at targeting more specifically this cell population. Previous studies showed that increased levels of the neurotrophic factor MIDKINE (MDK) are associated with poor prognosis in patients with GBM. In this work, we investigated the role of MDK in the regulation of GICs biology.

Our results show that MDK regulates the maintenance of the self-renewal and tumorigenic capacity of GICs via ALK (Anaplastic Lymphoma Kinase) receptor stimulation. We also found that the mechanism by which the MDK/ALK axis regulates GICs stem-like properties is, at least in part, based on its ability to control the stability of the transcription factor SOX9 (a transcription factor that contributes to maintain the stem-like properties of GICs and which increased expression has been associated to a lower overall survival of GBM patients). Thus, in this work we found that the genetic or pharmacological blockade of the MDK/ALK axis induces SOX9 degradation through the autophagy-lysosomal pathway in GICs cultures and that this early event is responsible for the loss of the self-renewal and tumorigenic properties of these cells.

Our findings also demonstrate that the pharmacological targeting of the MDK/ALK axis targets the population of GICs *in vitro* and in tumor xenografts. Moreover, blockade of the MDK/ALK signaling pathway enhances the response of GICs cultures to the treatment with temozolomide (TMZ, the benchmark agent for the management of GBM) or cannabinoids. Thus we found that treatment with these drug combinations eliminate the population of GICs thereby promoting a strong antitumoral effect in preclinical models of GBM.

Data presented here also show that the treatment with different ratios of THC (Δ^9 -tetrahydrocannabinol) and CBD (cannabidiol), the two main ingredients produced by the hemp plant *Cannabis sativa*, enhances the antiproliferative effect exerted by TMZ in GICs cultures. In particular, THC:CBD combinations containing a higher proportion of CBD targets more efficiently the population of GICs than THC:CBD at a 1:1 ratio .

In summary, data presented in this Thesis identify the role of the MDK/ALK/SOX9 axis as key signaling pathway involved in the regulation of the self-renewal and tumorigenic properties of GICs. Moreover, these findings provide strong preclinical evidence that the inhibition of this

ABSTRACT

signaling axis can be used as a potential therapeutic strategy to eliminate this cell population and to improve the efficacy of the treatments against GBM.

ABREVIATURAS

- 2-AG:** 2-araquidonoil glicerol
- 2-HG:** 2-hidroxiglutarato
- 3MA:** 3-metiladenina
- 5-ALA:** Ácido 5 aminolevulínico
- ABC:** *ATP-binding cassette*
- AC:** Adenilato ciclasa
- AEA:** Anandamida
- ALCL:** *Anaplastic Large Cell Lymphoma* (linfoma anaplásico de células grandes)
- ALDH:** *Aldehyde dehydrogenase* (aldehído deshidrogenasa)
- ALK:** *Anaplastic lymphoma kinase receptor* (quinasa del linfoma anaplásico)
- AMPK:** *Adenosine monophosphate-activated protein* (proteína quinasa activada por AMP)
- ATCC:** *American Type Cell Culture Collection*
- ATF4:** *Activating transcription factor 4* (factor activador de la transcripción 4)
- ATG:** *Autophagy-related gene* (gen relacionado con autofagia)
- ATP:** *Adenosine triphosphate* (adenosina trifosfato)
- BDS:** *Botanical drug substance* (extracto botánico enriquecido)
- BHE:** Barrera hematoencefálica
- cAMP:** *cyclic adenosine monophosphate* (AMP cíclico)
- CB₁:** *Cannabinoid receptor 1* (receptor cannabinoide 1)
- CB₂:** *Cannabinoid receptor 2* (receptor cannabinoide 2)
- CBD:** Cannabidiol
- CDKN2A:** *Cyclin dependent kinase inhibitor 2A* (Inhibidor 2A de la quinasa dependiente de ciclinas)
- cDNA:** *complementary DNA* (DNA complementario)
- CICs:** *Cancer Initiating Cells* (células iniciadoras de tumores)
- CMA:** *Chaperon-mediated autophagy* (autofagia mediada por chaperonas)
- CRIZO:** Crizotinib
- CSCs:** *Cancer Stem Cells*
- DAPI:** 4,6-diamino-2-fenil-indol
- DMEM:** *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
- DMP:** Dimetil pimelimidato
- DMSO:** Dimetilsulfóxido
- DNA:** *Deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)
- dNTP:** *Deoxynucleotide triphosphate* (deoxinucleótido trifosfato)
- Dox:** Doxiciolina
- DRAM1:** *DNA damage regulated autophagy modulator 1*
- ECL:** *Enhanced chemiluminescence* (quimioluminiscencia programada)

ABREVIATURAS

EDTA: *Ethylenediaminetetraacetic acid* (Ácido etilendiaminotetraacético)

EGF: *Epidermal growth factor* (factor de crecimiento epidérmico)

EGFR: *Epidermal growth factor receptor* (receptor para el factor de crecimiento epidérmico)

EGTA: *Ethylene glycol-bis (2-aminoethylether) tetraacetic acid*

eIF2 α : *Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit alpha* (subunidad α del factor eucariótico iniciador de la traducción)

EML4: *Echinoderm microtubule associated protein like 4*

ERK: *Extracellular signal-regulated kinase* (quinasa regulada por señales extracelulares)

FAAH: *Fatty acid amino hydrolase* (aminohidrolasa de ácidos grasos)

FAK: *Focal adhesion kinase* (quinasa de adhesión focal)

FBS: *Fetal Bovine Serum* (Suero fetal bovino)

FDA: *Food and Drug Administration* (administración de alimentos y medicamentos)

FGF: *Fibroblast growth factor* (factor de crecimiento de fibroblastos)

FGFR: *Fibroblast growth factor receptor* (receptor para el factor de crecimiento de fibroblastos)

GAPDH: *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa)

GBM: Glioblastoma multiforme

GFAP: *Glial fibrillar acid protein* (proteína glial fibrilar ácida)

GICs: *Glioma Initiating Cells* (células iniciadoras de glioma)

GPCR: *G-protein coupled receptor* (receptores acoplados a proteínas G)

GRB2: *Growth factor receptor bound protein 2* (proteína de unión al receptor de crecimiento epidérmico)

HER2: *Human epidermal growth factor receptor 2* (receptor para el factor de crecimiento epidérmico 2)

HGF: *Hepatocyte growth factor* (factor de crecimiento de hepatocitos)

HIF1 α : *Hypoxia inducible factor 1 subunit alpha* (factor inducible por hipoxia 1 α)

HMG: *High mobility box*

ID1-2: *Inhibitor of DNA binding 1-2* (inhibidores de la unión al DNA 1 y 2)

IDH: Isocitrato deshidrogenasa 1 y 2

IGF: *Insulin-like growth factor* (factor de crecimiento insulínico)

IGFBP2: *Insulin-like growth factor binding protein 2* (proteína de unión al factor de crecimiento insulínico 2)

I.P.: Intraperitoneal

IP₃: Inositol trifosfato

iRMN: Imagen de resonancia magnética nuclear

IRS-1: *Insulin receptor substrate 1* (sustrato del receptor de insulina 1)

JNK: *c-JUN N-terminal kinase* (quinasa del extremo N terminal de c-JUN).

LAMP1/2A: *Lysosomal associated membrane protein 1/2A* (proteínas asociadas a la membrana lisosomal 1 y 2A)

LBD: *Ligand-binding domain* (dominio de unión al ligando)

LDA: *Limiting dilution assay* (ensayos de dilución límite)

LDL: *Low density lipoprotein* (lipoproteína de baja densidad)

LIF: *Leukemia inhibitor factor* (factor inhibidor de leucemia)

LIR: *LC3-interacting-region* (región de interacción con LC3)

LKB1: *Liver kinase B1* (quinasa hepática 1)

LRP1: *LDL receptor-related protein 1* (receptor de lipoproteína de baja densidad)

MAM: *Meprin/A5- protein/PTPmu*

MAP1LC3A (LC3): *Microtubule associated protein 1 light chain 3 alpha* (cadena ligera de la proteína asociada a microtúbulos)

MAPK: *Mitogen-activated protein kinases* (quinasas activadas por mitógenos)

MDK: *MIDKINE* (MIDQUINA)

MDK Ab: Anticuerpo neutralizante de MDK (diseñado frente al dominio N terminal de la proteína)

MGMT: *O⁶-metilguanina metil transferasa*

MMP: *Matrix metalloproteinase* (metaloproteinasas de matriz)

mRNA: *Messenger RNA* (RNA mensajero)

MTIC: Monometil triazenoimidazol carboxamida

MTOR: *Mechanistic Target of Rapamycin Kinase* (quinasa diana de la rapamicina)

NADPH: *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced* (nicotinamida-adenina-dinucleótido fosfato)

NEFL: *Neurofilament light* (neurofilamento ligero)

NFKB: *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas)

NF-1: Neurofibromina 1

NK: *Natural killer*

NPM: Nucleofosmina 1

NSCL: *Non-small cell lung cancer* (cancer de pulmón no microcítico)

OLIG2: *Oligodendrocyte transcription factor 2* (factor de transcripción oligodendroglial 2)

OMS: Organización Mundial de la Salud

p/p: peso/peso

p/v: peso/volumen

PA: Pepstatina A

PBS: *Phosphate buffered saline* (tampón fosfato salino)

PDGFR: *Platelet derived growth factor receptor alpha* (receptor para el factor de crecimiento derivado de plaquetas)

PDX: *Patient derived xenografts* (xenoinjertos derivados de pacientes)

ABREVIATURAS

PEI: Polietilenimina

PI3K: *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase* (fosfatidil inositol 3 quinasa)

PIP₃: Fosfatidilinositol-(3,4,5)-trifosfato

PKA: *Protein Kinase A* (proteína quinasa A)

PKC: *Protein kinase C* (Proteína quinasa C)

PKG: *Protein kinase G* (Proteína quinasa dependiente de GMP cíclico)

PLC-γ: *Phospholypase C gamma 1* (fosfolipasa C gamma)

PMSF: *Phenylmethylsulfonyl Fluoride* (fluoruro de fenilmetilsulfonilo)

PPAR: *Peroxisome proliferator activated receptors* (receptores activados por el proliferador de peroxisomas)

pRb: Proteína retinoblastoma

PTB: *Phosphotyrosine-binding domain* (dominio de unión a fosfotirosinas)

PTEN: *Phosphatase and tensin homolog* (fosfatasa homóloga de tensina)

PTN: Pleiotropina

PTPRZ: *Protein tyrosine phosphatase receptor Type Z* (receptor tirosina-fosfatasa tipo Z)

qPCR: *Quantitative polymerase chain reaction* (reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa)

QT: Quimioterapia

RCAS: *Replication-Component ASLV long terminal repeat with Splice acceptor*

RE: Retículo endoplásmico

RNA: *Ribonucleic acid* (ácido ribonucleico)

ROS: *Reactive oxygen species* (especies reactivas de oxígeno)

RPM: Revoluciones por minuto

RT: Radioterapia

SALL2: *Spalt like transcription factor 2*

SCID: *Severe combined immunodeficient* (inmunodeficiencia severa combinada)

SDS: *Sodium dodecyl sulfate* (dodecil sulfato sódico)

SEC: Sistema endocannabinoide

SEM: Error estándar de la media

SH2: *SRC homology 2* (proteína homóloga de SRC)

SHH: Sonic Hedgehog

SLC12A5: *Solute Carrier Family 10 member 5*

SNC: Sistema nervioso central

SNP: *Single nucleotide polymorphism* (polimorfismo de nucleótido único)

SPT: Serina-palmitoil transferasa

SRY: *Sex determining region Y*

STAT3: *Signal transducer and activator of transcription 3* (transductor de señales y activador de la transcripción)

SURV: Survivina

TBP: *TATA-box binding protein* (proteína de unión a la caja TATA)

TBS-T: *Tris-buffer saline Tween 20* (tampon salino con Tween-20)

TCGA: *The Cancer Genome Atlas* (Atlas del Genoma del Cáncer)

TERT: *Telomerase reverse transcriptase* (transcriptasa inversa de la telomerasa)

THC: Δ^9 -tetrahidrocannabinol

TMZ: Temozolomida

TRIB3: *Tribbles pseudokinase 3*

TRPV1-2: *Transient receptor potential cation channel subfamily V member 1,2*)

TTF: *Tumor Treating Fields*

TVA: *Tumor virus A*

UBD: *Ubiquitin-binding domain* (dominio de unión a ubiquitina)

ULK1: *Unc-51 like autophagy activating kinase 1* (quinasa activadora de autofagia UNC-51)

VEGF: *Vascular endothelial growth factor* (factor de crecimiento endotelial vascular)

VEGFR2: *Vascular endothelial growth factor receptor 2* (receptor para el factor de crecimiento endotelial vascular tipo 2)

VEH: Vehículo

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

α -KG: Alpha-cetoglutarato

INTRODUCCIÓN

1. Gliomas

1.1 Descripción y clasificación de los tumores del sistema nervioso central

Hasta 2016, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha clasificado los tumores del sistema nervioso central (SNC) basándose exclusivamente en criterios histológicos, es decir, mediante el análisis de la morfología de la célula tumoral con la finalidad de determinar su origen (Louis et al., 2007). Así, dentro de los gliomas (tumores del SNC de origen neuroepitelial) podemos distinguir los astrocitomas (provenientes de los astrocitos), oligodendrogliomas (procedentes de los oligodendrocitos) y los oligoastrocitomas, que poseen un origen mixto oligodendroglial y astrocitario. Entre ellos, los más frecuentes son los astrocitomas, que pueden clasificarse también según su grado de malignidad:

1. Grado I (astrocitomas pilocíticos): Tumores no infiltrantes, bien delimitados, con baja actividad mitótica y que constituyen la forma más benigna de glioma. Representan el 5 % de todos los gliomas, apareciendo con mayor frecuencia en personas jóvenes.
2. Grado II (astrocitomas difusos): Poseen una baja actividad mitótica, escasa hiperplasia y atipia citológica. Suelen mostrar un carácter infiltrativo, produciendo un ensanchamiento y distorsión de las estructuras anatómicas afectadas e imposibilitando en muchos casos su resección completa.
3. Grado III (astrocitomas anaplásicos): Astrocitomas difusos e infiltrantes con mayor densidad celular y potencial proliferativo, atipia nuclear más marcada y anaplasia acompañada de mitosis. Este tipo de tumores tiene una gran tendencia a progresar a gliomas de grado IV.
4. Grado IV (glioblastoma multiforme): Constituyen la forma más agresiva y frecuente de gliomas, siendo el objeto de estudio de esta Tesis, por lo que sus características histológicas y moleculares se detallarán en los siguientes apartados.

1.2 Glioblastoma (GBM)

El glioblastoma es el tipo de glioma más frecuente y agresivo, llegando a suponer el 12-15% de las neoplasias intracraneales y el 60-75% de todos los tumores astrocitarios. Se estima que su incidencia anual es de 4 casos por cada 100.000 habitantes, con una media de edad de diagnóstico de en torno a los 62 años y con una supervivencia media de los pacientes que no supera los 15 meses de vida (Ostrom et al., 2014; Stupp et al., 2005). Histológicamente, estos tumores se caracterizan por un escaso grado de diferenciación, elevada actividad mitótica, y gran heterogeneidad celular que se plasma en la presencia de células de tamaño y morfología extremadamente variable con capacidad infiltrante. Son habituales en estos tumores además la hiperplasia vascular así como la presencia de necrosis en pseudoempalizada, es decir, la aparición de un área necrótica central rodeada de un conjunto de células con carácter altamente proliferativo (Louis et al., 2007).

INTRODUCCIÓN

Desde un punto de vista molecular, numerosas alteraciones genéticas y epigenéticas han sido detectadas a lo largo de los últimos años en pacientes con GBM (Pearson & Regad, 2017; Riemenschneider & Reifenberger, 2009). Basándose en el análisis de expresión y en la secuenciación de DNA de más de 200 muestras procedentes de pacientes con GBM, el Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA) ha identificado 3 vías de señalización frecuentemente alteradas en estos tumores (TCGA, 2008; Brennan et al., 2013), como se resume en la **Figura I1**.

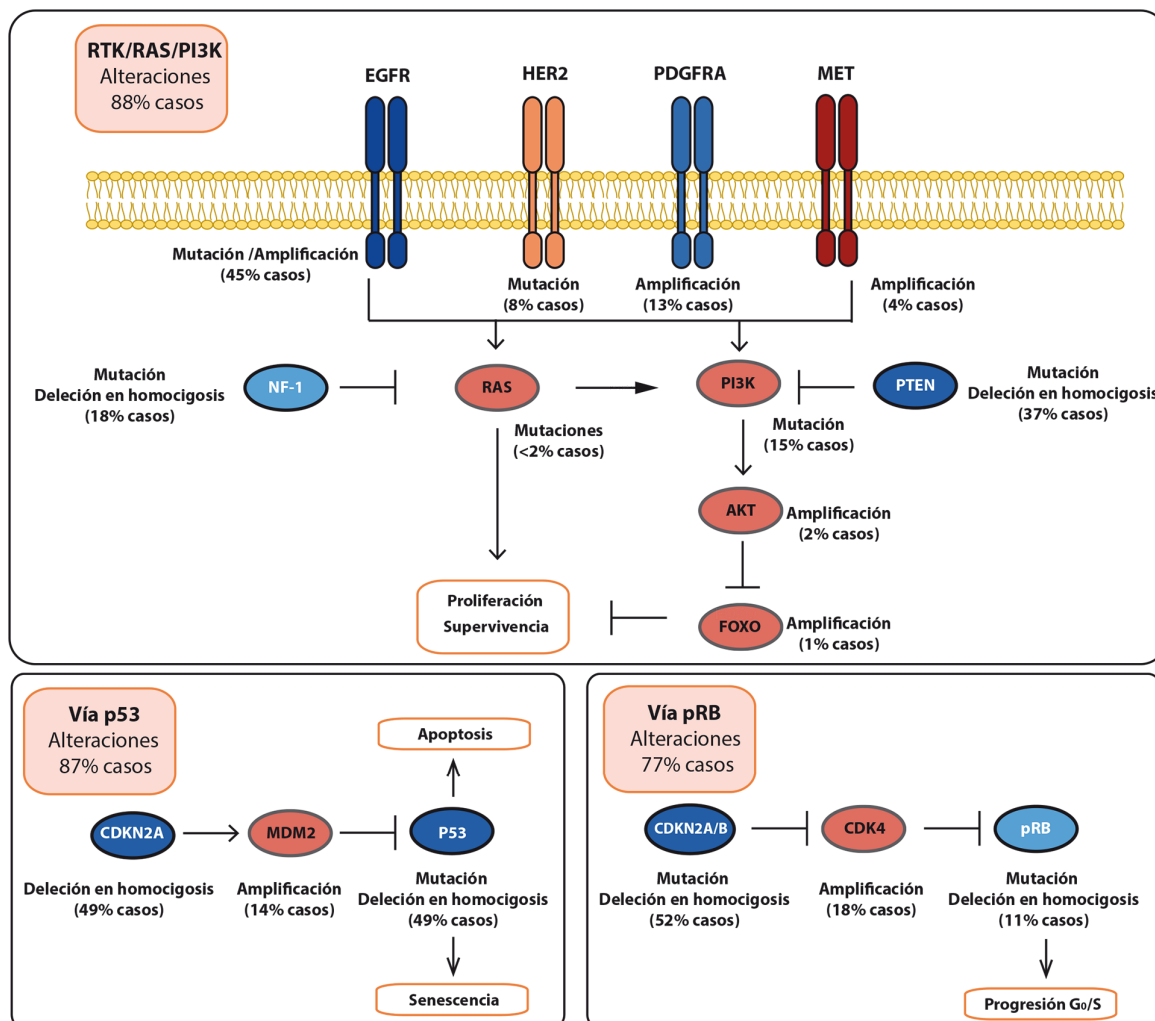


Figura I1. Rutas de señalización frecuentemente alteradas en GBM. En cada caso, se indica el tipo de mutación que de forma más frecuente se asocia a cada elemento de la vía de señalización y su frecuencia de aparición en pacientes con GBM. Adaptado de Van Meir et al., 2010.

De forma abreviada, se han encontrado amplificaciones en numerosos receptores con actividad tirosina-quinasa como el receptor para el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), el receptor para el factor de crecimiento de hepatocitos (cMET), para el factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR) y especialmente del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), en el que también se han detectado otras mutaciones como deleciones en su dominio extracelular que conllevan su activación constitutiva (Frederick et al., 2000; Brennan et al., 2013). Estas alteraciones confluyen en la estimulación de vías de señalización intracelulares como la de la PI3K (fosfatidil inositol-4,5-bisfosfato 3-

quinasa)/AKT y RAS (Li et al., 2016), que también pueden encontrarse sobre-activadas por la presencia de mutaciones en reguladores claves de estas vías como PTEN (del inglés *Phosphatase and tensin homolog*) y NF-1 (neurofibromina-1) respectivamente (Lino & Merlo, 2011; Aldape et al., 2015). Del mismo modo, se han encontrado alteraciones en componentes clave de aquellas rutas que regulan la proliferación y el ciclo celular como la vía de p53 y la proteína retinoblastoma (pRb).

1.2.1 Clasificación del GBM

El GBM puede clasificarse como primario o secundario. La mayoría de los GBM diagnosticados son primarios, es decir, aparecen *de novo*, mientras que tan solo un 5-10% de ellos son secundarios y provienen de la progresión maligna de los gliomas de bajo grado. Aunque histológicamente no se han encontrado diferencias entre estos subtipos, sí existen diferencias en cuanto a su incidencia y a las alteraciones moleculares que presentan. Así, mientras los GBM primarios presentan con frecuencia amplificaciones en *EGFR*, deleciones en *CDKN2A* (inhibidor 2 de quinasas dependientes de ciclinas) y *pRB*, pérdida del cromosoma 10 así como mutaciones en *PTEN*, los secundarios muestran principalmente alteraciones en *TP53*, e *IDH1-2* así como la hipermetilación del promotor del gen *pRb* y la sobre-expresión de *PDGFR* (Figura I2).

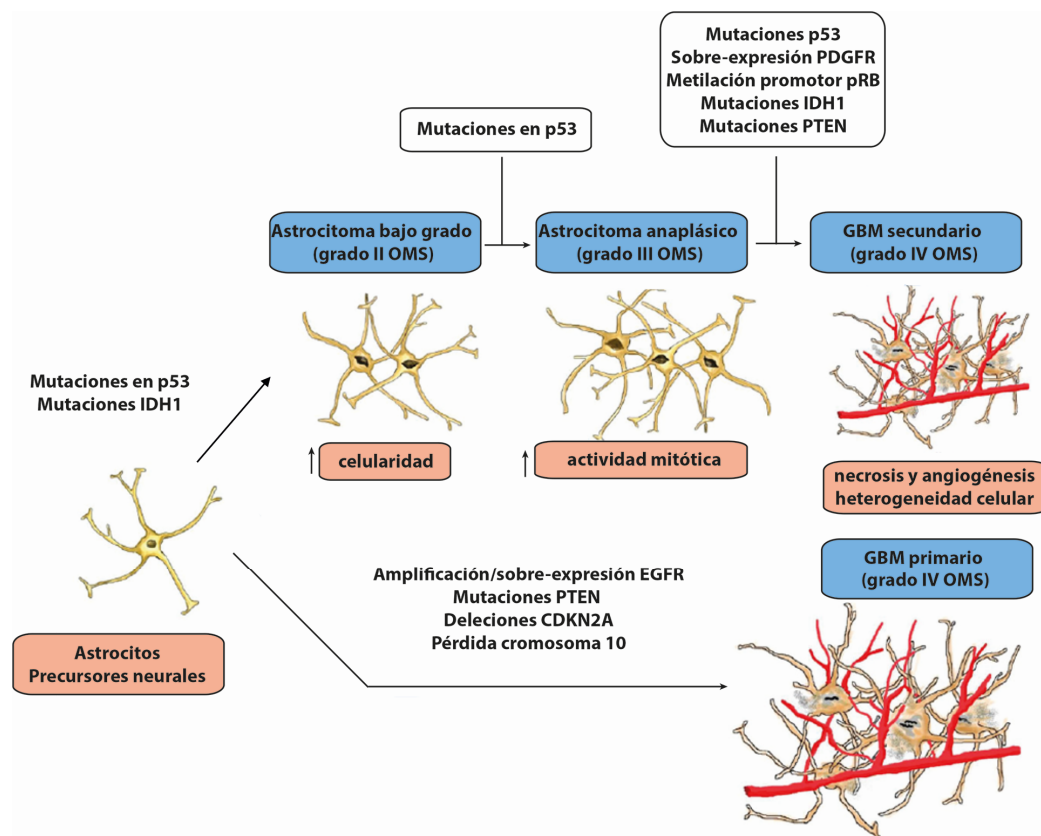


Figura I2. Características moleculares del GBM primario y secundario. Descripción de las principales alteraciones moleculares y características celulares descritas en GBM primario y secundario. Adaptado de Chen et al., 2012.

También la edad de detección del GBM difiere en ambos casos: mientras los primarios se diagnostican principalmente en pacientes mayores de 60 años, la edad media del diagnóstico en los GBM secundarios es de en torno a los 45 años (Nakamura et al., 2007).

La normativa establecida por la OMS en 2016 incluye una nueva clasificación basada en la presencia de mutaciones en el gen *IDH-1* (**Cuadro 1**), que se utiliza tanto como un criterio diagnóstico como pronóstico.

- Cuadro 1

El gen *IDH1* se encuentra localizado en el cromosoma 2q33 y codifica una enzima que cataliza la descarboxilación oxidativa del isocitrato a α -ketoglutarato (α -KG) con liberación de NADPH. La mutación que de forma más frecuente aparece en GBM (más del 85% de los casos) es la R132H, donde una arginina es sustituida por una histidina en la posición 132, crítica para la unión del isocitrato y que impide la actividad catalítica normal de la enzima. Su acción protumoral parece estar relacionada con la producción de un metabolito alternativo, el 2 hidroxiglutarato (2-HG), que podría inhibir la actividad de numerosas enzimas dependientes de α -KG como demetilinas de histonas y prolil-hidroxilasas así como inducir una metilación masiva de islas CpG en el DNA. Por otro lado, la reducción en los niveles de NADPH producido podría disminuir los niveles de glutatión presente en el organismo y que son necesarios para reducir el efecto deletéreo de las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Parsons et al., 2008 ; Miller et al., 2017).

Así, los GBM con *IDH* no mutado son en su mayoría de origen primario, suponen un 90% de los casos diagnosticados y suelen presentar al mismo tiempo mutaciones en el promotor del gen *TERT* (que codifica una subunidad catalítica de la enzima telomerasa) y en *EGFR*. Por el contrario, los GBM con *IDH-1* mutado suponen un bajo porcentaje de los casos diagnosticados, provienen generalmente de GBM secundarios, muestran de forma muy frecuente alteraciones en *TP53* y *ATRX* (un gen implicado en la regulación de la transcripción y remodelación de la cromatina) y presentan un mejor pronóstico (la supervivencia media tras el tratamiento es de 31 meses frente a los 15 meses de los pacientes diagnosticados con un GBM *IDH* no mutado) (Hartmann et al., 2010; Louis et al., 2016). Además, la descripción detallada de las alteraciones moleculares presentes de forma habitual en el GBM, junto a datos clínico-patológicos, ha permitido la identificación de 4 entidades tumorales dentro del GBM con un perfil molecular diferenciado (clásico, mesenquimal, neural y proneural), y cuyas principales características se resumen en la **Figura I3** (Verhaak et al., 2010)

Asimismo, estudios publicados recientemente han ampliado nuestro conocimiento acerca de las alteraciones genéticas y epigenéticas presentes en el GBM, especialmente en lo que se refiere a la existencia de perfiles diferenciados de metilación del DNA. Estas observaciones pueden contribuir a reducir la heterogeneidad dentro de cada subtipo tumoral previamente establecido. De esta manera, se ha hipotetizado que variaciones en el patrón de metilación del DNA son cruciales para la progresión del GBM y pueden aportar pistas acerca

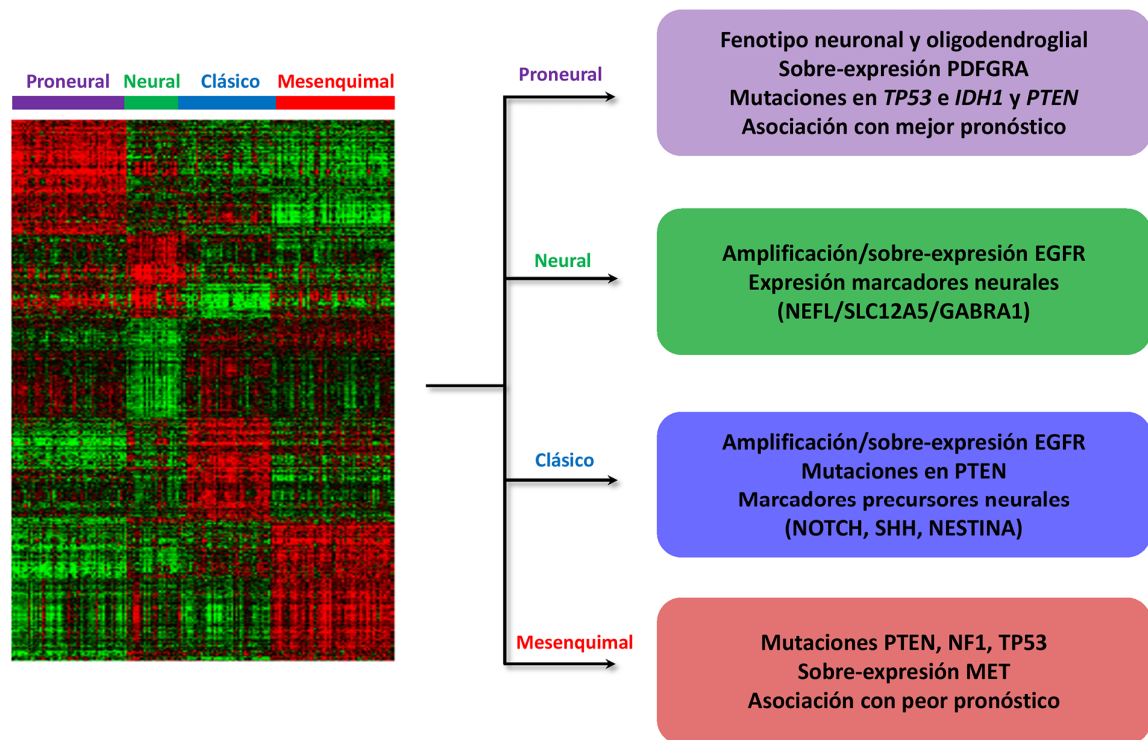


Figura I3. Características de los distintos subtipos moleculares de GBM. Perfil de expresión génica de 173 muestras de pacientes con GBM en los que se analizan los niveles de expresión (en rojo se muestra la sobre-expresión, y en verde la regulación a la baja) de 840 genes distintos, acompañado de un esquema resumen de las principales alteraciones moleculares encontradas en cada uno de los subtipos definidos por este análisis. NEFL: *Neurofilament light*; SLC12A5: *Solute Carrier family 12 member 5*; GABRA1: *Gamma-aminobutyric acid type A receptor alpha1 subunit*. Adaptado de Verhaak et al., 2010.

de los posibles mecanismos que gobiernan la gliomagenesis (Ceccarelli et al., 2016). Sin embargo, a pesar del potencial pronóstico o predictivo que podría tener la división del GBM en subtipos o entidades moleculares diferenciadas, hasta el momento no se ha podido realizar una estratificación de pacientes con GBM que permita la utilización de aproximaciones terapéuticas diferentes en función de las características moleculares de cada tumor.

1.2.2 Diagnóstico y tratamiento

Ante la sospecha de un tumor cerebral, se realiza una exploración física y neurológica del paciente (que puede presentar distintas manifestaciones clínicas dependiendo de la localización del tumor) seguida de pruebas radiológicas convencionales, que pueden ser complementadas con otras técnicas más específicas como la resonancia magnética o la tomografía axial computarizada. Tan solo el análisis microscópico del tumor (obtenido mediante biopsia estereotáxica o tras la cirugía del paciente) permite la confirmación de que el tumor observado es un GBM. La primera fase del tratamiento del GBM requiere por tanto de una cirugía que busca la máxima resección del tumor compatible con el mantenimiento de la mejor función neurológica posible. Una resección primaria óptima es el mejor predictor de la supervivencia global de los pacientes (Lacroix et al., 2001), por lo que este proceso se ha optimizado en los últimos años mediante la utilización de compuestos como el ácido 5-

aminolevulínico (5-ALA) y la introducción de la cirugía asistida por neuronavegador, que permiten una mejor identificación de regiones sanas y tumorales. Sin embargo, esta resección suele ser incompleta debido al carácter infiltrante del tumor, por lo que se requiere la aplicación de un tratamiento complementario.

La terapia estándar postquirúrgica incluye la administración combinada de radioterapia (RT) y quimioterapia (QT) con el fármaco temozolomida (TMZ) (Stupp et al., 2005). La TMZ es un agente alquilante del DNA administrado de forma oral con capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) y sufrir una rápida conversión no enzimática a pH fisiológico para formar el metabolito activo monometil triazenoimidazol carboxamida (MTIC). Este compuesto metila la guanina del DNA dando lugar a la O⁶-metilguanina, que inhibe la replicación e induce la apoptosis de la célula tumoral (Zhang J et al., 2012). La efectividad de la acción de la TMZ depende de la expresión de la enzima O⁶-metilguanina metil transferasa (MGMT), que cataliza la eliminación de los grupos metilo introducidos en las guaninas del DNA tras el tratamiento con TMZ. De esta manera, una alta expresión de MGMT produce resistencia a la inducción de la apoptosis promovida por este fármaco. Cuando el promotor de *MGMT* se encuentra metilado, la expresión de la enzima se reduce drásticamente, lo que se relaciona con una mayor sensibilidad de las células del tumor a la acción de la TMZ. Así, la metilación del promotor de *MGMT* constituye el principal factor predictivo de la respuesta a TMZ (Hegi et al., 2005).

A pesar del agresivo tratamiento que se aplica a los pacientes con GBM, cerca de un 95% de ellos sufre recidivas en un período corto de tiempo. Las principales causas que explican este hecho son la dificultad para llevar a cabo una resección quirúrgica completa del tumor y la existencia dentro de este tipo de tumores de una población de células con características similares a las de las células progenitoras (denominadas frecuentemente “*stem-like*”), que son altamente resistentes a los tratamientos antitumorales y de las que hablaremos posteriormente. Actualmente, no existe un tratamiento estándar de segunda línea bien definido para tratar un GBM recidivado puesto que todas las opciones puestas en práctica en la clínica tales como una nueva cirugía, la utilización de otros agentes quimioterapéuticos como las nitrosueras o las sales de platino (Westphal et al., 2003), los inhibidores de topoisomerasas o la administración de anticuerpos monoclonales dirigidos frente a VEGF como el bevacizumab (Kreisl et al., 2009) no han tenido un gran impacto en la supervivencia de estos pacientes.

En los últimos años, ha emergido con fuerza la utilización de nuevos tratamientos para los pacientes con GBM, ya sea en primera o segunda línea. Uno de los más notorios se basa en la utilización de campos eléctricos con polaridad alternante (TTF del inglés *Tumor Treating Fields*), capaces de interferir en la mitosis de células en división, contribuyendo así a disminuir la capacidad proliferativa de las células tumorales. Este tratamiento está aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration*) desde 2015 y se ha demostrado que, añadido a la radioquimioterapia convencional, incrementa en hasta 3 meses tanto la supervivencia libre

de progresión como la supervivencia global de pacientes con GBM sin mostrar efectos secundarios indeseados relevantes en el paciente (Stupp et al., 2017). Además, se han desarrollado ensayos clínicos en el contexto del GBM utilizando diferentes moléculas que interfieren con las rutas de señalización frecuentemente alteradas en este tipo de tumores, o bien de aquellas que modulan la respuesta inmune (inmunoterapia antitumoral). Entre estos ensayos destacan aquellos dirigidos frente al receptor EGFR. Así, los inhibidores de su actividad tirosina-quinasa de primera generación como el erlotinib o gefitinib, o de segunda generación como el dacomitinib, no han mostrado una mejora significativa en la supervivencia de los pacientes en los ensayos clínicos realizados hasta el momento a pesar de su prometedor efecto preclínico. También se han utilizado anticuerpos monoclonales dirigidos específicamente frente al receptor que han mostrado un beneficio limitado, probablemente debido a la dificultad que tienen para atravesar la BHE. Diversas moléculas dirigidas frente a rutas de señalización sobre-activadas en este tipo de tumores (entre las que destacan la vía de MTOR) se han probado en los últimos años en diferentes ensayos clínicos de GBM, aunque ninguna ha mostrado efectos significativos.

1.3 Origen de los gliomas. Células iniciadoras de tumores

La identificación de las células a partir de las cuales se originan los gliomas puede ayudar a comprender la enfermedad y por tanto a diseñar mejores tratamientos frente a ella. Durante muchos años, se ha asumido que el principal mecanismo de gliomagénesis es la transformación neoplásica de células gliales completamente diferenciadas, muy probablemente debido a que hasta hace poco tiempo se pensaba que la glía adulta era el único tipo de células capaz de dividirse en el cerebro postnatal, convirtiéndolas así en las únicas células susceptibles de transformación (Sanaï et al., 2005). Sin embargo, el descubrimiento de la formación de nuevas células neurales en el cerebro adulto a partir de células progenitoras neurales adultas localizadas en nichos neurogénicos como el giro dentado del hipocampo y zona subventricular de los ventrículos laterales, ha modificado este planteamiento y ha puesto el foco en la capacidad de estas células para constituir un sustrato para la transformación neoplásica. Así, aunque según el modelo estocástico cualquier célula tumoral puede funcionar como iniciadora del tumor por acumulación de una serie de mutaciones en ella y posterior selección por el propio microambiente tumoral, cada vez más evidencias sugieren que los tumores podrían originarse también siguiendo un modelo jerárquico (Hanahan & Weinberg, 2000). Esta teoría sostiene que tan solo una población minoritaria de células dentro del tumor, que comparten características biológicas con las células madre neurales (o bien las han adquirido por desdiferenciación de células maduras) poseen un crecimiento ilimitado responsable de la iniciación, crecimiento, heterogeneidad y recurrencia del tumor, denominándose células iniciadoras de tumores o CSCs (del acrónimo en inglés *Cancer Stem Cells*) (Vescovi et al., 2006; Alcantara Llaguno et al., 2009; Friedmann-Morvinski et al., 2012). Este tipo de células han sido aisladas de distintos tipos de tumores primarios, incluido el GBM, denominándose en este caso GICs [(de su acrónimo en inglés *Glioma Initiating Cells*) (Ignatova

et al., 2002; Galli et al., 2004; Singh et al., 2004; Chen et al., 2012)]. Estas células, mediante sucesivas divisiones simétricas y asimétricas, pueden auto-renovar su población y generar progenitores amplificadores más diferenciados con capacidad proliferativa limitada y que constituyen la población mayoritaria del tumor.

1.3.1 Características de las GICs. Métodos de identificación

Las GICs se caracterizan fundamentalmente por su capacidad ilimitada de auto-renovación *in vitro* (que puede ser valorada mediante ensayos de dilución límite) e *in vivo* (valorada mediante trasplante ortotópico seriado), su capacidad para formar una progenie diferenciada y su habilidad para generar tumores tras ser inyectadas intracranealmente, dando lugar a un tumor fenotípicamente idéntico al original que reproduce la heterogeneidad celular presente en la lesión inicial (Vescovi et al., 2006). Desde el punto de vista clínico, una de las características más relevantes de estas células es su elevada resistencia a los tratamientos habitualmente utilizados frente al GBM. Este hecho puede explicarse por varios motivos. Por un lado, estas células suelen encontrarse en un estado quiescente (fase G₀ del ciclo celular), lo que las hace menos susceptibles a la terapia con agentes tradicionales como la TMZ, que está dirigida a las células en proliferación. Por otro lado, presentan unos altos niveles de expresión de proteínas o transportadores de membrana del tipo ABC (*ATP binding cassettes*), que funcionan como ATPasas que expulsan los agentes quimioterapéuticos del interior celular, o de la enzima citosólica aldehído deshidrogenasa (ALDH), que actúa como detoxificante (Dean et al., 2005; Bleau et al., 2009). Igualmente, se han encontrado altos niveles de expresión de la enzima MGMT en distintos cultivos de GICs en comparación con sus correspondientes células diferenciadas (Happold et al., 2018), lo que unido a un incremento general de proteínas antiapoptóticas como BCL2 (Tagscherer et al., 2008) podrían contribuir a la resistencia habitualmente exhibida por estas células al tratamiento con TMZ. Además, la activación de distintas rutas de señalización como aquellas asociadas al daño al DNA (Ropolo et al., 2009; Cheng et al., 2011) o que participan en el mantenimiento del fenotipo *stem-like* como HIF1- α (*Hypoxia inducible factor 1 subunit alpha*), NOTCH, WNT o SHH (Sonic Hedgehog), también se han asociado con resistencia a radioterapia y TMZ en GICs (Wang et al., 2010; Ulasov et al., 2011). De esta forma, los tratamientos convencionales podrían actuar sobre la población mayoritaria de células tumorales diferenciadas, pero serían ineficaces a la hora de eliminar estas células iniciadoras de glioma (**Figura I4**).

Debido a sus implicaciones clínicas, la detección y aislamiento de las GICs presenta una gran relevancia en el GBM. De una forma general, las GICs pueden aislarse mediante su crecimiento en suspensión, formando esferas en un medio específico suplementado con factores mitogénicos como EGF y FGF (Lee et al., 2006). Hasta la fecha no se ha descrito la existencia de ningún marcador exclusivo o universal de GICs (al menos en parte debido a la inestabilidad genómica y epigenética que suele exhibir el GBM), aunque sí se han podido identificar una serie de genes o proteínas frecuentemente sobre-expresadas en este tipo de células en comparación con células más diferenciadas dentro del tumor. En muchos casos,

estos marcadores confieren una serie de características que permiten su identificación, especialmente mediante técnicas de citometría de flujo. Así por ejemplo la expresión de transportadores ABC hace que estas células excluyan colorantes como el Hoescht-33342, una técnica conocida como *side population*, aunque estudios recientes la consideran una técnica poco fiable para la identificación de este tipo de células (Broadley et al., 2011). También es útil la detección de moléculas de superficie como CD15, CD44 y especialmente CD133. La PROMININA-1 o CD133 es una glicoproteína de la superficie celular que caracteriza a subpoblaciones dentro del glioma con una elevada capacidad de auto-renovación así como de iniciar tumores *in vivo* (Singh et al., 2004) de forma que cambios en su patrón de glicosilación se han asociado con unos mayores niveles de expresión de esta proteína en cultivos de GICs (Kemper et al., 2010). Sin embargo, la presencia de estos marcadores de membrana no es un criterio necesario ni suficiente para identificar poblaciones de GICs (Beier et al., 2007). Otras proteínas como NESTINA, SOX2, MUSASHI-1, BMI1, OCT3-4 o la ya citada enzima ALDH también se han utilizado para identificar GICs, aunque su localización intracelular hace más compleja su identificación mediante técnicas de citometría de flujo (Molina et al., 2014).

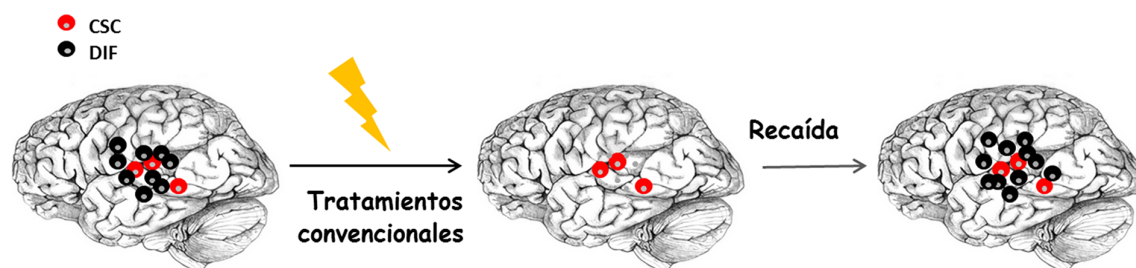


Figura 14. Esquema representativo del efecto ejercido por las terapias antitumorales convencionales (por ejemplo el tratamiento con TMZ) sobre las distintas poblaciones celulares presentes en un tumor como el GBM: las células iniciadoras de tumores o *Cancer Stem Cells* (CSC) y las células diferenciadas (DIF), que constituyen la mayor parte de la masa tumoral.

1.3.2 Vías de señalización que regulan las GICs. Factores de transcripción SOX

Las GICs se encuentran reguladas mediante distintos mecanismos, tanto intrínsecos (factores genéticos, epigenéticos y metabólicos) así como extrínsecos o dependientes del ambiente tumoral, que favorecen la activación de distintas rutas de señalización como la vía de SHH, WNT, NOTCH o EGFR (Lathia & Mack, 2015). En último término, muchos de estos factores y vías de señalización convergen en la activación de factores de transcripción que regulan la expresión génica, controlando procesos clave como la supervivencia, proliferación y auto-renovación de este tipo de células (Dietrich et al., 2010; Lathia & Mack, 2015). Algunos de estos factores importantes para el mantenimiento de la identidad de las GICs son MYC, STAT3 (del inglés *Signal transducer and activator of transcription 3*), FOXM1, GLI1 o NANOG (Fang et al., 2014; Sherry et al., 2009; Joshi et al., 2013; Zbinden et al., 2010), capaces a su vez de reclutar factores remodeladores de la cromatina para así promover la expresión de genes que mantienen el estado indiferenciado de estas células. Del mismo modo, los factores de transcripción SOXs (*SRY-related HMG-box*) han sido implicados en la regulación de las

propiedades semejantes a las de las células progenitoras (o “*stem-like*”) características de estas células, por lo que debido a su abundancia y a la multitud de funciones que regulan, a continuación se detalla su relevancia en el contexto de las GICs.

Los factores de transcripción SOX constituyen una familia de proteínas conservada a lo largo de la evolución caracterizada por la presencia de un dominio HMG (*high mobility group*) que permite su interacción con el DNA y que fue originalmente identificado en Sry (*Sex determining región Y*), un factor crucial en la determinación del sexo masculino de mamíferos (Sinclair et al., 1990). En esta clase de vertebrados se ha descrito la existencia de hasta 20 miembros distintos de esta familia, que pueden clasificarse en 8 grupos distintos, de la A a la H, dependiendo de la secuencia aminoacídica del dominio HMG (**Figura I5**). Mientras que los miembros de la misma familia llevan a cabo funciones similares o redundantes, los miembros pertenecientes a diferentes familias suelen inducir respuestas opuestas. Estructuralmente, los SOXs están integrados por un extremo N terminal en el que se encuentra el dominio HMG y una región C terminal más larga que posee un dominio de activación transcripcional que le permite llevar a cabo su función. Para ello, deben formar complejos con otras proteínas que actúan como coactivadores o correpresores transcripcionales ya sea de forma heteróloga (con miembros de la familia POU o PAX) o mediante dimerización homóloga (como es el caso de los miembros de la familia SOXE)(Kamachi & Kondoh, 2013).

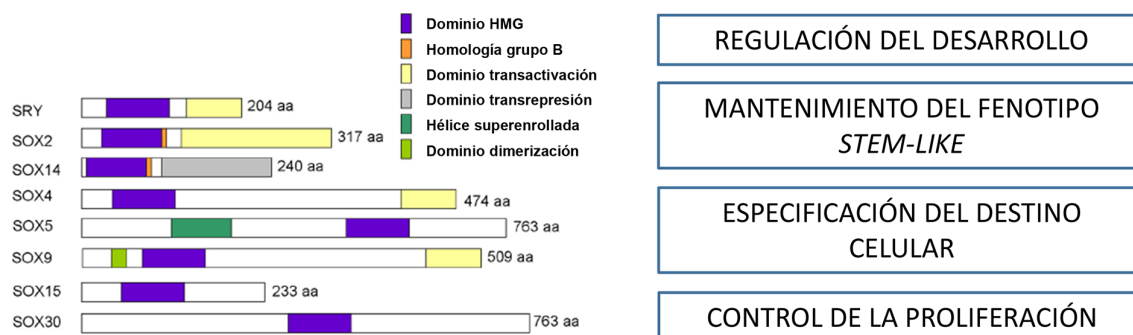


Figura I5. Estructura y funciones más representativas de los distintos miembros de la familia SOX. Adaptado de She & Yang 2015.

Los miembros de la familia SOX son reguladores de numerosas funciones, especialmente durante el desarrollo, entre las que se encuentran la determinación sexual, condrogénesis, hematopoyesis, desarrollo neural y neurogénesis. En particular, los miembros de la familia SOXB1 como SOX2, y de la familia SOXE como SOX9, desempeñan un papel muy relevante en la especificación glial y neuronal así como en el mantenimiento de las propiedades de las células progenitoras, contribuyendo a la homeostasis y regeneración de tejidos también en el adulto, y en especial en el SNC (Scott et al., 2010; Kang et al., 2012; Acanda de la Rocha et al., 2014). Por este motivo, la presencia de mutaciones o la modificación en los niveles de expresión o activación de estos factores de transcripción se ha correlacionado con el desarrollo de distintos tipos de tumores como pulmón, cervix, colon,

mama, próstata y especialmente glioma (Bass et al., 2009; Thomsen et al., 2010; Matheu et al., 2012; Castillo & Sanchez-Céspedes, 2012).

Así, la expresión de SOX2 se ha correlacionado con un fenotipo más agresivo, al menos en parte, debido a su capacidad para mantener y expandir la población de células iniciadoras de tumores como las GICs, en las que favorece el mantenimiento de sus propiedades *stem-like* y su quimioresistencia (Gangemi et al., 2009; Jeon et al., 2011). Recientemente se ha descrito que SOX2, junto a los factores de transcripción POU3F2, SALL2 y OLIG2, puede actuar de forma coordinada para reprogramar células diferenciadas de GBM en GICs (Suvà et al., 2014).

SOX9 por su parte favorece la progresión tumoral, la metástasis y la angiogénesis actuando corriente abajo (*downstream*) de distintas vías de señalización como las de WNT, SHH, NOTCH, EGFR o FGFR (Ling et al., 2011; Eberl et al., 2012; Martini et al., 2013). Igualmente estimula la expresión de genes implicados en el control del ciclo celular, la transición epitelio mesénquima (EMT), la adhesión celular o en el mantenimiento de las propiedades *stem-like* (Matheu et al., 2012; Guo et al., 2012; Larsimont et al., 2015; Santos et al., 2016). En el caso particular de glioma, se ha descrito que SOX9 participa en el origen de este tipo de tumores (Glasgow et al., 2017), y altos niveles de expresión de este factor de transcripción se correlacionan con una menor supervivencia global de los pacientes (Wang et al., 2012). De esta forma, el silenciamiento de SOX9 reduce la capacidad proliferativa, invasiva y de formación de tumores derivados de líneas celulares y cultivos primarios de GBM, favoreciendo el arresto del ciclo celular y la apoptosis (Swartling et al., 2009; Wang et al., 2012; Gao et al., 2015; Hiraoka et al., 2015; Liu et al., 2015). Además, una disminución en sus niveles de expresión sensibiliza estas células al tratamiento estándar con TMZ (Garros-Regulez et al., 2016; Xu et al., 2018). Por el contrario, la expresión ectópica de SOX9 favorece la transformación maligna de células madre neurales de forma dependiente de la vía de SHH (Swartling et al., 2012). A pesar de estas sólidas evidencias, el papel de SOX9 en la oncogénesis es controvertido, puesto que también se ha descrito que podría estar desempeñando una función antiproliferativa y proapoptótica en tumores como melanoma y próstata (Drivdahl et al., 2004).

Por último, cabe destacar que, debido a la amplia variedad de funciones que ejercen en la célula, los miembros de la familia SOX se encuentran altamente regulados mediante la participación de distintos mecanismos moleculares. Además de la regulación transcripcional ejercida por algunas de las rutas de señalización citadas previamente, así como por otros miembros de la familia SOXs y miRNAs (Ikushima et al., 2009; Cai et al., 2013; Garros-Regulez et al., 2016; Liu et al., 2017), estos factores de transcripción pueden ser regulados a nivel post-traducciona l mediante fosforilación, ubiquitinación o SUMOilación. Estas modificaciones pueden alterar la actividad, estabilidad y localización subcelular de la proteína, modificando con ello las funciones que desempeñan en diferentes contextos celulares (de Crombrughe et al., 2000; Bernard & Harley, 2010; She & Yang, 2015) (**Figura I6**).

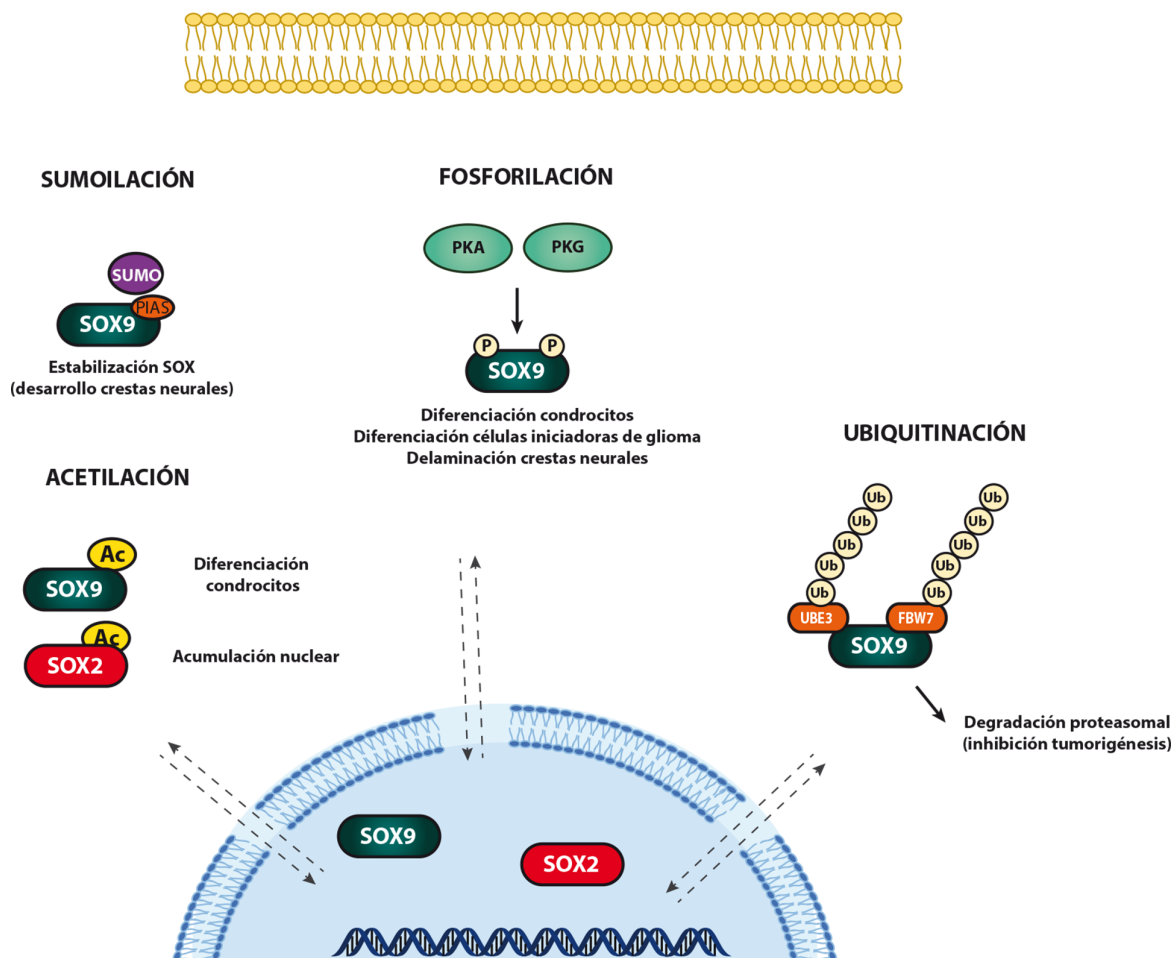


Figura I6. Mecanismos de regulación post-traduccionales de SOXs. Resumen esquemático de las modificaciones post-traduccionales más relevantes (acetilación, fosforilación, sumoilación y ubiquitinación) ejercidas sobre la familia de proteínas SOXs, con algunos ejemplos de las funciones intracelulares reguladas por estos mecanismos. Adaptado de She & Yang 2015.

1.4 Modelos animales de glioma

La utilización de ratones para modelar enfermedades humanas está ampliamente extendida en la investigación clínica. En el caso particular del cáncer, y a diferencia de los modelos con invertebrados, el desarrollo del tumor en el ratón se acompaña de procesos complejos parecidos a los que ocurren en el humano como la angiogénesis y la metástasis. Estos modelos suelen permitir un control espacio temporal del desarrollo tumoral, lo que facilita conocer el papel desempeñado por determinados genes o proteínas en su desarrollo o bien el efecto de terapias farmacológicas concretas. Una de las opciones más extendidas es la generación de tumores mediante la implantación de líneas celulares o de células derivadas de un paciente con tumor (también conocidos como PDX de sus siglas en inglés *patient-derived xenografts*) en ratones inmunodeficientes, siendo estos últimos capaces de reproducir de una forma más verosímil las características genéticas e histológicas del tumor original. Por otro lado, el desarrollo de modelos genéticos es particularmente útil para identificar aquellas

alteraciones o eventos moleculares responsables de la iniciación y desarrollo tumoral, pudiendo mostrar la secuencia de eventos que tienen lugar durante la progresión tumoral e identificar aquellas células responsables de la iniciación del tumor. Además, permiten estudiar el papel desempeñado por el microambiente y el sistema inmune en la biología del tumor. Sin embargo, las alteraciones genéticas inducidas son en muchos casos homogéneas, lo que puede no reflejar por completo la heterogeneidad genómica y fenotípica que es característica del GBM (Stylli et al., 2015).

Los esfuerzos iniciales destinados a desarrollar modelos genéticos de gliomas utilizando delecciones de un solo gen supresor tumoral resultaron un fracaso, ya que como los análisis masivos posteriores demostraron, son necesarias múltiples alteraciones en vías de señalización claves para el mantenimiento de la homeostasis tumoral. Comenzaron a desarrollarse entonces modelos genéticos basados en la sobre-expresión de vías de señalización dependientes de receptores con actividad tirosina-quinasa tales como EGFR o PTEN junto a la pérdida de expresión de genes relacionados con el control del ciclo celular como *TP53*, *pRB*, *INK4/ARF* o *NF-1* (Zhu et al., 2009; Chow et al., 2011), lo que ha permitido avanzar en el conocimiento de las células de origen de los gliomas y en la descripción de subtipos fenotípica y molecularmente distintos de GBM (Alcantara Llaguno et al., 2015).

Sin embargo, el elevado tiempo de latencia (con el consecuente gasto económico) necesario para la formación de algunos de estos tumores condujo al desarrollo de modelos genéticos alternativos. Uno de ellos es el modelo RCAS-TVA (*Replication-Component ASLV long terminal repeat with Splice acceptor-tumor virus A*), cuya descripción detallada se incluye en el siguiente epígrafe, puesto que ha sido utilizado a lo largo del desarrollo de esta Tesis.

1.4.1 Características generales del modelo transgénico TVA

El modelo TVA consta de 2 elementos principales: por un lado un vector viral RCAS, derivado de un retrovirus aviar, que contiene la maquinaria necesaria para la producción de virus gracias a la expresión de los genes *gag* (que codifica las proteínas estructurales del virus), *env* (proteínas de la envuelta) y *pol* (que codifica la transcriptasa inversa y la integrasa) y en el que se puede introducir el cDNA correspondiente al gen que queremos sobre-expresar (gen X); y por otro una línea de ratón transgénico que expresa el receptor TVA para RCAS. La expresión de este receptor se encuentra regulada por un promotor tejido-específico, en este caso *Nestina* (modelo *Nestina-Tva*), por lo que tan solo las células progenitoras neurales del SNC son susceptibles a la infección y transferencia génica dependiente de los vectores RCAS, permitiendo así la expresión del correspondiente gen de interés. La producción de vectores virales requiere la utilización de células DF-1 derivadas de fibroblastos embrionarios de pollo, que se transfectan con los plásmidos RCAS y se inyectan intracranealmente en los ratones *Nestina-Tva*. La liberación de los vectores virales en el cerebro del ratón permite la infección

selectiva de las células del mamífero que poseen el receptor TVA, y que serán las únicas que sobre-expresarán la proteína de interés X (Fisher et al., 1999; Werder et al, 2012)(Figura I7).

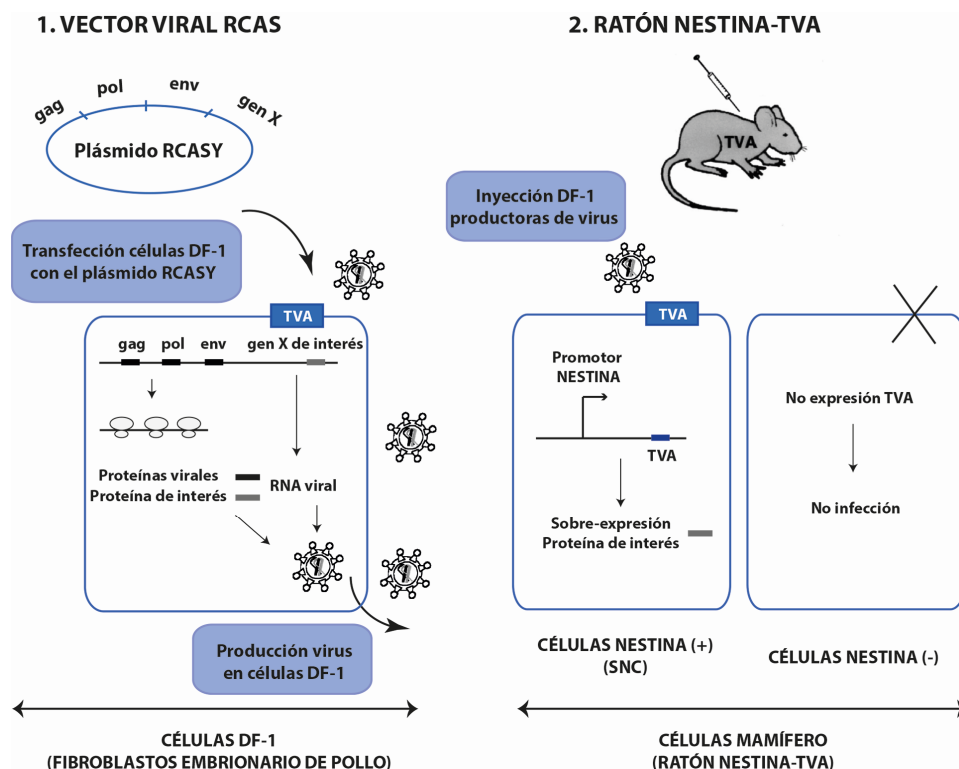


Figura I7. Modelo transgénico *Nestina-Tva*. Esquema que representa los componentes del sistema transgénico *Nestina-Tva* (vector viral RCASY y ratón transgénico *Nestina-Tva*) así como los eventos necesarios que ocurren tanto en las células DF-1 como en las células del ratón, y que permiten la sobre-expresión de la proteína de interés X. Adaptado de Fisher et al., 1999.

A diferencia de las células aviares, las células de mamífero no producen suficiente cantidad de proteínas virales (incluida la de la envuelta), de forma que el receptor TVA no queda ocupado, haciendo que sea susceptible a la co-infección o la re-infección con sucesivos vectores RCAS. Este hecho confiere una gran ventaja a la utilización de este modelo puesto que permite estudiar el efecto de la introducción simultánea o secuencial de distintos genes en los progenitores neurales, y de esta manera evaluar su papel en la gliomagénesis sin necesidad de recurrir a varias cepas o cruces de ratones. Además, este sistema confiere selectividad espacial (tan solo aquellas células del ratón que expresen el receptor serán susceptibles a la infección y transferencia génica) y temporal (derivada del momento elegido para realizar la inyección) (Ahronian & Lewis, 2014). Sus mayores limitaciones son la incapacidad para introducir en el vector RCAS insertos de más de 3 Kb (imposibilitando el clonaje de oncogenes importantes como EGFR) y la baja tasa de infección del tejido diana observada en algunos tipos de tumores, lo que puede provocar que tan solo los oncogenes más potentes sean capaz de formar tumores *in vivo* (Seidler et al., 2008).

El sistema RCAS-TVA ha permitido modelizar distintos tipos de tumores como mama, páncreas, meduloblastoma o glioma (Ahronian & Lewis, 2014) e incluso componentes del estroma tumoral (Vervoort et al., 2008). En el contexto de glioma, el modelo RCAS-TVA ha

aportado información clave acerca de la cooperación existente entre las alteraciones detectadas en las vías de señalización de EGFR o PDGFB y aquellas que afectan a rutas de control de ciclo celular (Holland et al., 1998; Dai et al., 2001; Bachoo et al., 2002) y de respuesta a daño al DNA (Squatrino et al., 2010) en la generación de gliomas de alto grado. Igualmente ha puesto de relieve la importancia de las células progenitoras en la generación de este tipo de tumores (Holland et al., 2000) y más recientemente ha aportado información acerca de la sucesión de eventos moleculares que se producen durante la evolución de los distintos subtipos de GBM, así como el posible origen común de algunos de ellos (Ozawa et al., 2014). Por último, la combinación del sistema TVA con el sistema CRISPR-Cas9 ha permitido la generación de un nuevo modelo genético de glioma que ha demostrado utilidad para evaluar preclínicamente el efecto de terapias específicas (Oldrini et al., 2018).

2. Cannabinoides

El término cannabinoide fue acuñado en 1963 por el investigador Raphael Mechoulam y hace referencia a todos aquellos compuestos activos derivadas de la planta *Cannabis sativa*, comúnmente denominada marihuana. Se estima que estas sustancias químicas han sido utilizadas desde tiempos milenarios (unos 2500 años a.C.) por culturas orientales con fines espirituales, terapéuticos o recreativos dada la amplia variedad de efectos que producen en el cuerpo humano (imitando así el efecto de los cannabinoides sintetizados por nuestro propio organismo, denominados endocannabinoides). Entre estos efectos destacan la alteración de la consciencia y la percepción del entorno, así como su capacidad analgésica, antipirética, orexigénica o anti-inflamatoria.

En función de su origen, los cannabinoides pueden clasificarse en:

1. Fitocannabinoides:

Compuestos naturales producidos por la planta *Cannabis sativa*, de la que se han aislado más de 150 fitocannabinoides distintos (Hanuš et al., 2016). De ellos, el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC), es el más importante debido a su abundancia en la planta y a que este compuesto es el principal responsable de la psico-actividad asociada al consumo de marihuana. El THC fue caracterizado estructuralmente en 1964 (Gaoni & Mechoulam, 1964) y se ha demostrado que produce multitud de efectos en el organismo, debido en gran parte a su capacidad para actuar como agonista parcial de los receptores de membrana CB₁ y CB₂ (*cannabinoid receptors 1/2*), clonados 25 años después (Matsuda, Lolait, Brownstein, Young, & Bonner, 1990; Munro et al., 1993) y que forman parte del llamado sistema cannabinoide endógeno.

Otro de los fitocannabinoides más estudiado es el cannabidiol (CBD), que carece de efecto psicoactivo y presenta una baja afinidad por los receptores CB₁ y CB₂. El CBD exhibe propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y anticonvulsivantes. Aunque no se ha identificado de manera precisa cuales son las dianas del organismo a través de las cuales actúa el CBD, se ha propuesto que este compuesto puede actuar, al menos en parte, mediante su unión a receptores vanilloides TRPV1-2 (*transient receptor potential cation channel subfamily V member 1,2*)(Massi et al., 2013), algunos receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas (GPCRs) huérfanos como GPR18, GPR55 o GPR119 y los receptores PPAR (*peroxisome proliferator activated receptors*) (Pertwee et al., 2010).

2. Endocannabinoides:

La caracterización de los receptores cannabinoides hizo pensar a los investigadores que debía existir una fuente endógena de cannabinoides capaz de unirse a esos receptores. Así, en 1992 se identificó la anandamida (AEA) como primer cannabinoide endógeno, producido mayoritariamente en el cerebro pero en menor medida también por el bazo, corazón o testículos (Devane et al., 1992). Tres años más tarde, se aisló el segundo ligando

endógeno, el 2-araquidonoil glicerol (2-AG), presente en multitud de tejidos como cerebro, intestino, páncreas, hígado o pulmón (Mechoulam et al., 1995). Estos ligandos endógenos son sintetizados por enzimas específicas: la N-acetiltransferasa y la fosfolipasa D en el caso de la AEA y por la enzima diacilglicerol lipasa en el caso del 2-AG, existiendo igualmente enzimas encargadas de su degradación como la enzima aminohidrolasa de ácidos grasos (FAAH) para el AEA y la monoacilglicerol lipasa para el 2-AG. En conjunto, los endocannabinoides AEA y 2-AG, sus correspondientes enzimas de síntesis y degradación, así como los receptores CB₁ y CB₂ integran el denominado sistema endocannabinoide (SEC).

3. Cannabinoides sintéticos:

Constituyen análogos de los endocannabinoides o fitocannabinoides que han sido desarrollados en el laboratorio con la finalidad de hacerlos más potentes o selectivos frente a los receptores cannabinoides, de forma que poseen un gran potencial terapéutico (Wasik et al., 2011). Algunos ejemplos de estos cannabinoides sintéticos se recogen en la **Tabla I1**.

Agonistas cannabinoides		Antagonistas cannabinoides	
CB ₁	CB ₂	CB ₁	CB ₂
<ul style="list-style-type: none"> • HU210 • WIN55212-2 	<ul style="list-style-type: none"> • HU210 • WIN55212-2 • HU308 • JWH-133 	<ul style="list-style-type: none"> • SR141716 (SR1) 	<ul style="list-style-type: none"> • SR144528 (SR2) • AM630

Tabla I1. Principales cannabinoides sintéticos Tabla resumen con los principales cannabinoides sintéticos divididos en agonistas y antagonistas de los receptores cannabinoides CB₁ y CB₂.

2.1 Señalización intracelular dependiente de CB₁ y CB₂

Los cannabinoides ejercen la mayoría de sus efectos uniéndose a los receptores CB₁ y CB₂, pertenecientes a la familia de receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas (GPCRs) caracterizados por presentar 7 segmentos transmembrana. CB₁ se encuentra ampliamente distribuido en el SNC, presentando mayor abundancia en los ganglios basales, cerebelo, neocortex e hipocampo, aunque está presente también en tejidos periféricos como corazón, testículo, próstata, tejido vascular y sistema inmune. CB₂ por su parte se expresa fundamentalmente en células del sistema inmune, desempeñando un papel relevante en la inflamación y respuesta inmune. También se ha descrito su presencia en determinadas poblaciones del SNC como progenitores neurales, microglía activada y determinados tipos neuronales tras daño celular, así como en tejidos periféricos como hígado o páncreas (Atwood & Mackie, 2010; Di Marzo, 2018).

Ambos receptores se acoplan fundamentalmente a proteínas G de tipo inhibitorio G_{i/o}, que pueden actuar sobre distintos sustratos, favoreciendo en último término la inhibición de la neurotransmisión y de la excitabilidad neuronal de forma retrógrada. Así, la señalización corriente abajo de los receptores de cannabinoides puede llevar a la inhibición (dependiente

de subunidades α i/o) de la adenilato ciclasa (AC), disminuyendo los niveles de adenosina 5'-monofosfato cíclico (cAMP) y la señalización dependiente de la proteína quinasa A (PKA), involucrada en la regulación de la expresión génica y de otras rutas de señalización como la vía de MEK/ERK, mediante su acción sobre RAF. Estas subunidades también modulan canales iónicos, ya sea de forma positiva (activando canales de potasio transitorios de tipo A y canales de potasio rectificadores que contribuyen a la hiperpolarización de la membrana) o negativa (inhibiendo canales de potasio de tipo D que activan la onda inicial de entrada de calcio y canales de calcio de tipo N y P/Q) (Demuth & Molleman, 2006).

Además, los cannabinoides regulan distintas vías de señalización implicadas en el control de la proliferación celular y la supervivencia. Así, las subunidades β y activan las vías de RAS/MEK/ERK, PI3K/AKT/MTORC1 o las vías relacionadas con estrés celular p38MAPK o de la quinasa del extremo N-terminal de c-JUN (JNK) (Sánchez et al., 2003; Velasco et al., 2012). Igualmente, la activación de CB₁ está asociada a la generación de mensajeros secundarios como las ceramidas y dihidroceramidas, que regulan los procesos de supervivencia y muerte celular (Guzmán et al., 2001; Gómez del Pulgar et al., 2002; Salazar et al., 2009; Hernández-Tiedra et al., 2016) así como de calcio intracelular. Esta liberación no depende solamente de su acción sobre canales de Ca²⁺, sino también del acoplamiento a proteínas G_q, que promueven la acción de la fosfolipasa C, la activación de receptores de IP₃ en el RE y la subsecuente activación de la proteína quinasa C (PKC) (De Petrocellis et al., 2007).

2.2 Papel del sistema endocannabinoide

Estos mecanismos de señalización intracelular regulan multitud de procesos fisiológicos en el organismo al actuar sobre distintos sistemas:

1. Sistema nervioso: Los cannabinoides modulan los procesos de aprendizaje y memoria por su acción en hipocampo y corteza; controlan el movimiento actuando en ganglios basales y cerebelo y regulan los niveles de ansiedad, las emociones y la percepción sensorial actuando en amígdala y tálamo. Del mismo modo intervienen en la nocicepción por su acción sobre la médula espinal y el tronco cerebral, en la emesis mediante su interacción con receptores cannabinoides del tronco cerebral y el núcleo del tracto solitario o en el apetito el control de la ingesta y la temperatura por su acción en el hipotálamo (Pertwee, 2009; Di Marzo, 2018). En el SNC, los cannabinoides regulan también la proliferación, diferenciación y migración de progenitores neurales tanto en estadios embrionarios como en los nichos neurogénicos existentes en el adulto (Galve-Roperh et al., 2013; Díaz-Alonso et al., 2016).

2. Sistema endocrino: Los cannabinoides tienen un efecto inhibitorio sobre la producción de hormonas sexuales, tiroideas o del crecimiento. Así, intervienen en la reproducción, especialmente la masculina, al inhibir la espermatogénesis, la motilidad y la capacitación espermática (Maccarrone & Wenger, 2005).

3. Metabolismo energético: Además de regular el apetito mediante la estimulación de áreas mesolímbicas e hipotálamicas del cerebro, los cannabinoides también promueven la gluconeogénesis y la síntesis de ácidos grasos en tejidos periférico, al menos en parte, mediante su acción sobre la AMPK (*Adenosine monophosphate-activated protein*) (Bellocchio et al, 2008).

4. Otras funciones: Los cannabinoides también regulan la presión sanguínea y la respuesta inmune e inflamatoria, en este último caso de forma dependiente, principalmente, de la acción de CB₂ (Pertwee, 2009).

2.3 Papel de los cannabinoides en cáncer:

La participación del sistema endocannabinoide en los numerosos procesos fisiológicos citados, ha permitido utilizar los cannabinoides en el contexto de diferentes enfermedades, entre ellas el cáncer, fundamentalmente con una finalidad paliativa, como se detallará en la sección referente a los fármacos cannabinoides.

Adicionalmente a esa acción paliativa, desde mediados de la década de los 70 se tienen evidencias de la acción antitumoral de los cannabinoides (Munson et al., 1975). Multitud de estudios posteriores han confirmado que distintos cannabinoides (entre los que se incluyen fitocannabinoides como THC y CBD, endocannabinoides como AEA y 2-AG o agonistas sintéticos de los receptores CB₁ y CB₂) inhiben el crecimiento y la proliferación de distintos tipos de tumores *in vitro* e *in vivo* (Sánchez et al., 2001; Torres et al. 2011; Velasco et al., 2012). En conjunto, estos datos indican que la estimulación farmacológica de los receptores cannabinoides posee un efecto antitumoral.

A pesar de las sólidas evidencias que apoyan que los cannabinoides tienen una clara función antitumoral, algunos trabajos han demostrado que también podrían favorecer la proliferación y la progresión de algunos tipos de tumores. Así por ejemplo, la utilización de cannabinoides a bajas dosis (rango nanomolar) en astrocitomas puede estimular la supervivencia de las células tumorales, ya sea de forma dependiente de AKT o de la activación o represión de otras vías de señalización como EGFR y de factores de crecimiento como la anfi-regulina (Hart et al., 2004; Cudaback et al., 2010). También se ha propuesto que la modulación del sistema inmune dependiente de la activación de CB₂ podría contribuir a este efecto protumoral en cáncer de mama y pulmón (Zhu et al., 2000; McKallip et al., 2005). Sin embargo, la amplia variedad de contextos celulares en los que distintas dosis de cannabinoides producen un efecto antiproliferativo apoyan su posible uso como agentes antitumorales. Esta acción antitumoral la llevan a cabo mediante la activación de distintos mecanismos de señalización.

2.3.1 Mecanismos de acción antitumoral de los cannabinoides

Los cannabinoides inhiben la progresión tumoral actuando sobre mecanismos clave que están relacionados con la supervivencia y progresión de las células tumorales (**Figura 18**):

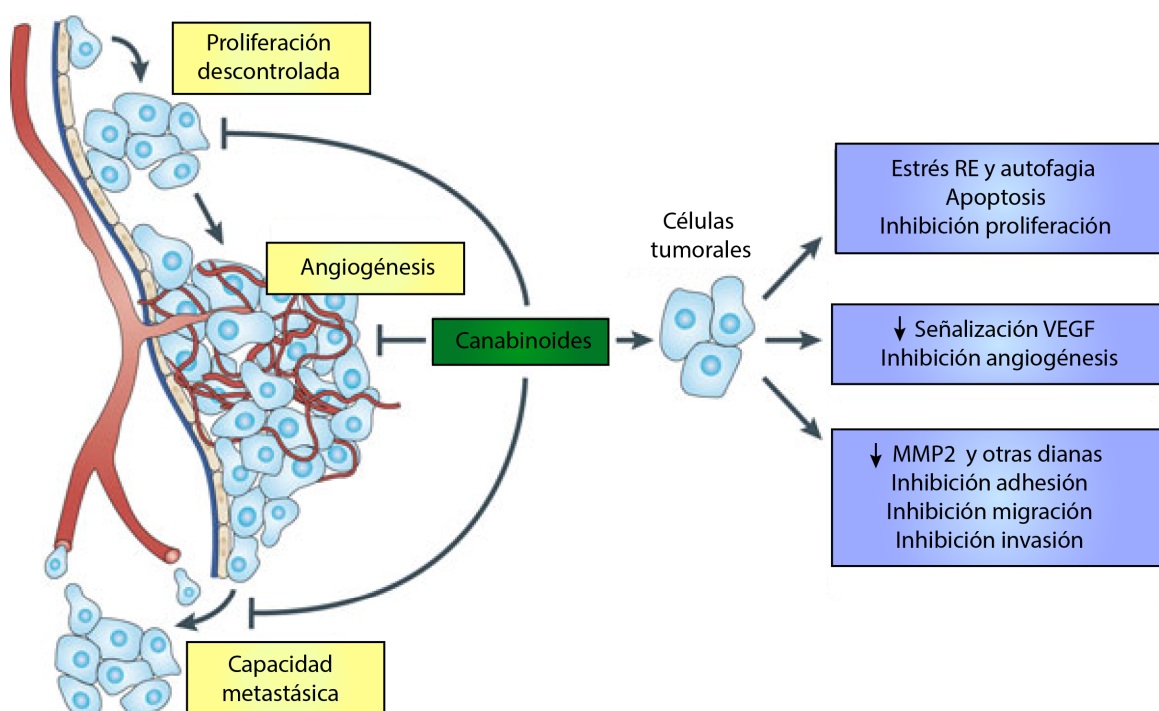


Figura 18. Mecanismos de acción antitumoral de los cannabinoides. Los cannabinoides inhiben la progresión tumoral actuando sobre distintas dianas que regulan la proliferación, la angiogénesis y la capacidad metastásica de las células tumorales. Adaptado de Velasco et al., 2012.

1. Inhibición de la proliferación celular e inducción de muerte celular:

La activación de receptores CB₁ o CB₂ induce arresto del ciclo celular y muerte celular por apoptosis en distintos tipos de células tumorales como mama, melanoma, próstata, hígado y glioma (Caffarel et al., 2006; Velasco et al., 2012). Dado que muchos de estos estudios se han llevado a cabo en células de glioma, la ruta de señalización que conduce a la apoptosis selectiva de estas células tumorales ha sido descrita con detalle en los últimos años. De esta manera, los cannabinoides, y en particular el THC, mediante su unión a los receptores CB₁ y CB₂, activan la enzima serina palmitoil transferasa (SPT), que estimula la síntesis *de novo* del esfingolípido ceramida, un proceso clave para la inducción de la parada en el ciclo celular y para el desarrollo de la respuesta apoptótica no solo en glioma (Galve-Roperh et al., 2000; Sánchez et al., 2001; Gómez del Pulgar et al., 2002), sino también en otros tipos de tumores como mama, próstata, colon o páncreas (Mimeault et al., 2003; Carracedo et al., 2006; Cianchi et al., 2008). El incremento en la síntesis de ceramida, unido a la inhibición del transporte de este esfingolípido desde el retículo endoplasmático (RE) al Golgi, desencadena una respuesta de estrés de RE que conlleva un incremento en la fosforilación de la subunidad α del factor eucariótico iniciador de la traducción (elf2 α). Este proceso favorece la sobre-expresión de reguladores transcripcionales implicados en la progresión tumoral como p8 (Carracedo et al., 2006) y algunos de sus efectores como ATF4, CHOP así como la pseudoquinasa TRIB3

(*Tribbles pseudokinase 3*), también relacionada con la tumorigénesis (Salazar et al., 2015). De esta manera, TRIB3 puede interaccionar e inhibir a la quinasa AKT, con la consecuente inactivación del complejo MTORC1 y la estimulación final de una muerte celular apoptótica dependiente de autofagia (Salazar et al., 2009; Hernández-Tiedra et al., 2016)(Figura 19).

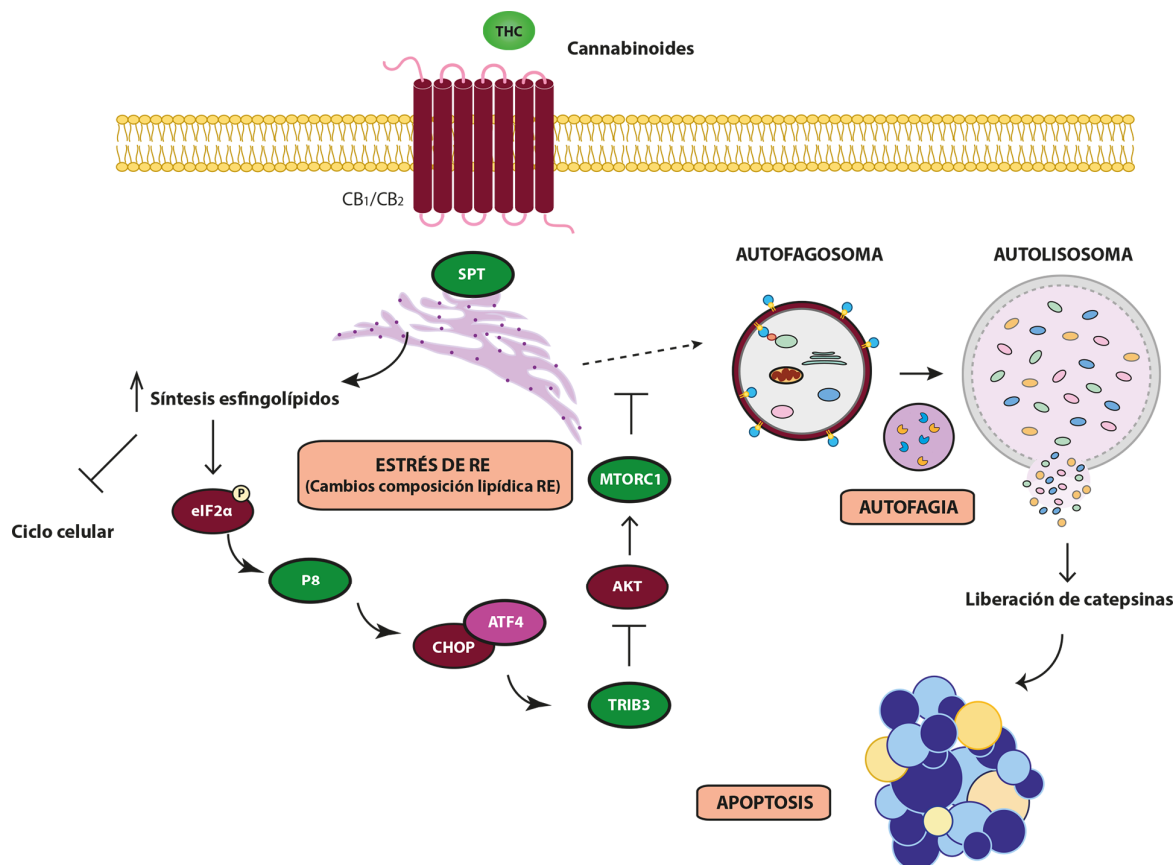


Figura 19. El tratamiento con cannabinoides induce la muerte apoptótica de células de glioma. Descripción de los mecanismos de señalización intracelular desencadenados por los cannabinoides en líneas celulares de glioma. Además de inhibir el crecimiento y la progresión tumoral, los cannabinoides modifican la composición lipídica del RE activando una cascada de señalización intracelular que promueve la autofagia citotóxica de estas células. Adaptado de Velasco et al., 2012 y Hernández-Tiedra et al., 2016.

Además del THC y diferentes agonistas cannabinoides, el CBD también induce la apoptosis de células tumorales. Los mecanismos moleculares que median esta acción no se han dilucidado por completo, aunque parecen deberse, al menos en parte, a su capacidad para potenciar la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) de forma dependiente, en muchos casos, de la activación del receptor TRPV2. Esta producción de ROS se correlaciona directamente con inhibición de la proliferación celular y especialmente con la inducción de apoptosis en distintos tipos de tumores como cáncer de próstata (De Petrocellis et al., 2013), mieloma múltiple (Morelli et al., 2014), glioma (Nabissi et al., 2013; Singer et al., 2015), mama (McAllister et al., 2011; Murase et al., 2014) o pulmón (Ramer et al., 2013).

2. Inhibición de la capacidad invasiva y metastásica:

Los cannabinoides disminuyen la capacidad invasiva y metastásica de distintos tipos de tumores como los gliomas, donde reducen de forma selectiva los niveles de expresión de

la metaloproteinasa de matriz 2 (MMP2), asociada a mal pronóstico en pacientes con este tipo de tumores (Blazquez et al., 2008). Igualmente, la estimulación de CB₁ y CB₂ reduce la migración de células tumorales de pulmón *in vitro* (Preet et al., 2008) e inhibe la invasión y metástasis en cáncer de mama (Qamri et al., 2009), al menos en parte de forma dependiente de FAK y SRC (Grimaldi et al., 2006). Por su parte, el CBD también reduce la capacidad invasiva y metastásica disminuyendo los niveles de proteínas inhibidoras de la diferenciación como ID1 en cáncer de mama (McAllister et al., 2007; McAllister et al., 2011) o mediante la reducción de la expresión de HIF-1 α en glioma (Solinas et al., 2013).

3. Inhibición de la capacidad angiogénica:

Los cannabinoides inhiben la angiogénesis actuando fundamentalmente sobre la ruta de señalización de VEGF, cuya activación es clave tanto en las células tumorales como en las del estroma, para la inducción de la proliferación vascular (Das & Marsden, 2013). El THC y los agonistas CB₁ y CB₂ bloquean tanto la producción de factores proangiogénicos como VEGF, angiopoyetina-2 e ID3 como la activación de VEGFR-2 *in vitro* e *in vivo* en glioma y carcinoma de piel (Casanova et al., 2003; Blázquez et al., 2004). Del mismo modo, se ha descrito que los cannabinoides pueden inhibir la migración de las células endoteliales, lo que disminuye la capacidad angiogénica del tumor y con ella la migración y metástasis (Pisanti et al., 2007). También el CBD ha demostrado inhibir la angiogénesis de distintos tipos de tumores como pulmón (Ramer et al., 2014) o glioma (Solinas et al., 2012) mediante mecanismos que no han sido completamente dilucidados.

Adicionalmente a estos mecanismos, se ha descrito que los cannabinoides también pueden modular la respuesta inmune antitumoral e inducir la diferenciación de células iniciadoras de tumores (Aguado et al., 2007; Hausteine et al., 2014)

2.3.2 Resistencia a la acción antitumoral de los cannabinoides

El desarrollo de resistencias a la acción de las terapias que se utilizan frente al cáncer es uno de los principales obstáculos en la lucha contra las neoplasias malignas. Esta resistencia puede deberse a la heterogeneidad tumoral, la presencia de células iniciadoras de tumores o la activación de rutas de señalización compensatorias que impiden la muerte celular inducida por los agentes antitumorales. En este último caso, la actuación de factores autocrinos (producidos por la propia célula tumoral) o paracrinos (producidos por las células del estroma tumoral) desempeña un papel muy relevante en la adquisición de resistencias a determinados compuestos antitumorales, confiriendo una serie de características moleculares a los tumores (o a determinadas células dentro del mismo) que pueden determinar su comportamiento o su respuesta a distintos fármacos.

En lo que se refiere a la resistencia a la acción antitumoral de los cannabinoides, el número de estudios realizados hasta el momento es relativamente limitado. En todo caso, estudios llevados a cabo por nuestro grupo de investigación han identificado una serie de

genes cuya sobre-expresión se correlaciona con la resistencia mostrada por algunas líneas celulares de glioma a la acción antitumoral del THC. Uno de esos genes codifica para el factor de crecimiento MIDQUINA (MDK), que como veremos en la siguiente sección, está relacionado con malignidad y progresión tumoral en distintos tipos de tumores, entre ellos los gliomas. En estos tumores, la unión de MDK al receptor ALK (*Anaplastic lymphoma kinase*) interfiere en la respuesta de estrés de RE e inducción de autofagia proapoptótica que promueve el THC (Lorente et al., 2011). Del mismo modo, unos niveles incrementados de anfiregulina (un factor de crecimiento capaz de unirse al receptor del factor de crecimiento epidérmico EGFR) promueven la resistencia a la acción antitumoral del THC mediante la estimulación de la vía de ERK y la subsecuente inhibición de la expresión de p8 y TRB3 (Lorente et al., 2009). Estos datos han servido como prueba de concepto de que la combinación de cannabinoides con inhibidores de rutas de señalización que promueven resistencia a estos fármacos (como podrían ser el eje MDK/ALK o anfiregulina/EGFR) podría ser una buena estrategia terapéutica para potenciar el efecto antitumoral de estos compuestos.

2.3.3 Combinación de cannabinoides y otros agentes antitumorales. Efecto de las terapias combinadas

El uso de terapias combinadas que son capaces de actuar sobre distintas rutas de señalización habitualmente alteradas en los tumores ha demostrado ser más eficaz que el uso de tratamientos basados en la utilización de un único fármaco para inhibir la progresión de distintos tipos de tumores. Los cannabinoides no son una excepción, y múltiples evidencias sugieren que la combinación de cannabinoides con otros agentes quimioterapéuticos como la gemcitabina, el paclitaxel o el 5-fluorouracilo podrían actuar de forma sinérgica frente a tumores de próstata o carcinomas gástricos y colorrectales (Donadelli et al., 2011; Miyato et al., 2009; Gustafsson et al., 2009). En glioma, la administración combinada de THC y TMZ posee un potente efecto antitumoral en tumores subcutáneos generados con líneas celulares de glioma tanto sensibles como resistentes a la acción de este agente alquilante mediante una potenciación de la autofagia pro-apoptótica inducida por el tratamiento individual con cannabinoides (Torres et al., 2011).

Otra estrategia terapéutica dentro del contexto de las terapias combinadas con cannabinoides consiste en la utilización de preparaciones que contienen THC y CBD, especialmente en una proporción 1:1, similar al fármaco Sativex (Ver más detalles en la sección fármacos cannabinoides). Esta combinación presenta una serie de ventajas frente a la utilización exclusiva de THC, ya que el CBD posee un efecto antitumoral por sí mismo, permite reducir las dosis de THC necesarias para producir un efecto antitumoral, y es capaz de disminuir los efectos psicoactivos promovidos por el THC, mejorando su tolerabilidad. Así, la combinación de THC y CBD posee un fuerte efecto antitumoral cuando ambos se administran de forma individual (Marcu et al., 2010) o en combinación con TMZ o radioterapia en glioma y melanoma (Torres et al., 2011; Armstrong et al., 2015; Scott et al., 2014).

2.3.4 Ensayos clínicos con cannabinoides como agentes antitumorales

Estos prometedores datos preclínicos han conducido al desarrollo de 2 ensayos clínicos en pacientes con GBM. En el primero de ellos, en fase I, participaron 9 pacientes con GBM que habían experimentado recidivas tras el tratamiento inicial con radioterapia y quimioterapia (segunda línea), a los que se le administró THC intracranealmente. Además de no detectarse efectos secundarios graves derivados de esta administración, algunos pacientes mostraron una reducción significativa del tamaño tumoral [evaluada mediante imagen de resonancia magnética nuclear (iRMN)]. El análisis posterior de las muestras obtenidas de los tumores de dos de estos pacientes mostró que el tratamiento con THC estimula la ruta de señalización descrita en modelos preclínicos, es decir, un incremento en los niveles de p8 y TRIB3, inhibición de MTORC1 con activación de autofagia y apoptosis, y disminución de los niveles de VEGF y MMP2 (Guzmán et al., 2006).

A pesar de que no pueden extraerse conclusiones significativas de un estudio que incluye un número tan reducido de pacientes, estos esperanzadores resultados, junto con los datos preclínicos descritos en el apartado anterior y que mostraban la existencia de una acción sinérgica entre la combinación de THC:CBD y TMZ, sirvieron de base para el desarrollo de otro ensayo clínico, también en segunda línea, pero esta vez en fase I y II, diseñado por la compañía farmacéutica británica GW Pharmaceuticals. En este estudio se han incluido 26 pacientes a los que, además del tratamiento con el fármaco TMZ, se les ha administrado Nabiximols (Sativex, un fármaco cannabinoide que contiene proporciones iguales de THC y CBD) o bien placebo. A expensas de la publicación de los datos definitivos, GW Pharmaceuticals ya ha anunciado que los pacientes tratados con Nabiximols (que no experimentaron efectos secundarios graves derivados de este tratamiento) presentaron una tasa de supervivencia a 1 año del 83%, frente al 53% de los pacientes tratados con placebo ($p=0,042$), que vivieron, de media, unos 200 días menos que los pacientes tratados con cannabinoides (www.clinicaltrials.gov número de identificación NCT01812603). Estos datos ponen de manifiesto que el tratamiento con cannabinoides y TMZ podría ser una estrategia terapéutica que podría contribuir a mejorar el tratamiento del GBM.

2.4 Aplicaciones terapéuticas (fármacos cannabinoides)

Los amplios efectos exhibidos por los cannabinoides hacen de este sistema una diana farmacológica muy potente y prometedora para el tratamiento de distintas enfermedades. Por ese motivo, fármacos cuyo principal componente activo es un cannabinoide, han sido aprobados por la FDA para el tratamiento de algunas enfermedades:

1. Sativex® (Nabiximols en EEUU): Spray oromucosal obtenido a partir de extractos de la planta que contienen THC y CBD en una proporción 1:1 junto a una mínima cantidad de otros componentes no cannabinoides. Este fármaco está aprobado en 21 países para el tratamiento de la espasticidad asociada a la esclerosis múltiple, y recientemente ha sido aprobado en Israel para el tratamiento del dolor crónico.

INTRODUCCIÓN

2. Marinol® y Cesamet®: Sus principales componentes activos son derivados sintéticos del THC, dronabinol y nabilona respectivamente. Están indicados para el tratamiento de la anorexia asociada a la pérdida de peso en pacientes con VIH así como para la atenuación de las náuseas y vómitos asociados a la administración de agentes quimioterapéuticos cuando los antieméticos convencionales no muestran efectos.

3. Epidiolex®: El pasado mes de junio de 2018, la FDA aprobó el uso de este fármaco, cuyo principio activo es el CBD, para el tratamiento de casos severos de epilepsia infantil como el síndrome de Dravet y el de Lennox-Gastaut.

3. MIDQUINA (MDK)

3.1 Descripción general. Estructura y regulación

La MDK es un factor de crecimiento descubierto en 1988 como el producto de un gen sobre-expresado durante las etapas tempranas de la diferenciación inducida por ácido retinoico en células de carcinoma embrionario (Kadomatsu, 1988). Comparte aproximadamente un 50% de identidad de secuencia con la pleiotropina (PTN), el otro miembro de la familia de factores de crecimiento asociados a su unión a heparina, que fue aislada de forma casi simultánea del útero bovino y del cerebro de rata perinatal en 1989 (Rauvala, 1989; Milner et al., 1989), y que posee funciones similares a las exhibidas por la MDK (Li et al., 1990).

Los niveles de MDK son elevados durante la embriogénesis, especialmente en las etapas intermedias de la gestación (“Midkine” en inglés proviene de **mid**-gestation – **cytokine**) (Kadomatsu et al., 1990). En el adulto, por el contrario, se expresa en bajos niveles en localizaciones muy restringidas tales como riñón, intestino, epidermis y epitelio bronquial así como en linfocitos y macrófagos (Muramatsu, 2014), aunque su expresión puede ser inducida en diferentes tejidos tras la aparición de daño tisular (Sato et al., 2001), promoviendo el crecimiento y la supervivencia celular, la tumorigénesis y la respuesta inflamatoria (Muramatsu, 2014).

3.2 Regulación de la expresión génica de MDK y estructura proteica

El gen de la MDK humana (*MDK*) se localiza en el brazo corto del cromosoma 11 (p11.2) y está flanqueado por los genes de la diacilglicerol kinasa ζ y el receptor colinérgico muscarínico (Kaname et al., 1996). Su región promotora presenta lugares de unión para el ácido retinoico, NF κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), β -CATENINA, el producto del gen supresor del tumor de Wilm’s, o el factor de transcripción SP-1, lo que explica que altos niveles de MDK hayan sido observados en distintos tipos de tumores, en isquemia y en procesos inflamatorios (Reynolds et al, 2004; Luo et al., 2015). El gen de *MDK* está integrado por 4 exones codificantes y se ha descrito la existencia de hasta 7 isoformas distintas de mRNA debido a diferencias en el *splicing* y en el sitio de iniciación de la transcripción, lo que puede dar lugar al menos a 2 productos proteicos distintos (VA-MDK y tMDK). La forma VA presenta 2 aminoácidos adicionales en el extremo N-terminal y posee una vida media más larga que la forma tMDK, que carece del tercer exón y cuya expresión se correlaciona con el desarrollo de distintos tipos de tumores, estimulando su capacidad invasiva y metastásica (Nobata et al., 2005; Muramatsu, 2014).

El producto de la expresión de *MDK* es una proteína de 121 aminoácidos y un peso molecular de 13 KDa rica en aminoácidos básicos y cisteínas. La estructura primaria de la MDK está muy conservada a lo largo de la evolución (así por ejemplo la MDK humana y murina presentan un 87% de identidad de secuencia). La MDK ha sido aislada de todas las especies

de vertebrados estudiados hasta el momento. Así, se han encontrado dos isoformas diferentes de MDK (denominadas a y b) en el pez cebra (*Danio rerio*) y *Xenopus laevis*. Del mismo modo, dos moléculas estructuralmente similares a la MDK denominadas Miple (Miple-1 y Miple-2) han sido aisladas en *Drosophila melanogaster* (Englund et al., 2006).

Estructuralmente, la molécula de MDK humana presenta 2 dominios bien diferenciados compuestos por 3 β -láminas antiparalelas y sostenidos por puentes disulfuro (**Figura I10**). El dominio N terminal contribuye a la estabilización de la proteína y es necesario para su dimerización espontánea, esencial para muchas de sus funciones como la estimulación de la actividad fibronolítica en células endoteliales. Por su parte, el dominio C terminal está implicado directamente en su actividad biológica, presentando 2 sitios de unión a heparina (*clusters* 1 y 2) y permitiendo su interacción con receptores como el PTPR ζ (*Protein tyrosine phosphatase receptor type Z*) (Muramatsu, 2014; Dianat et al., 2015).

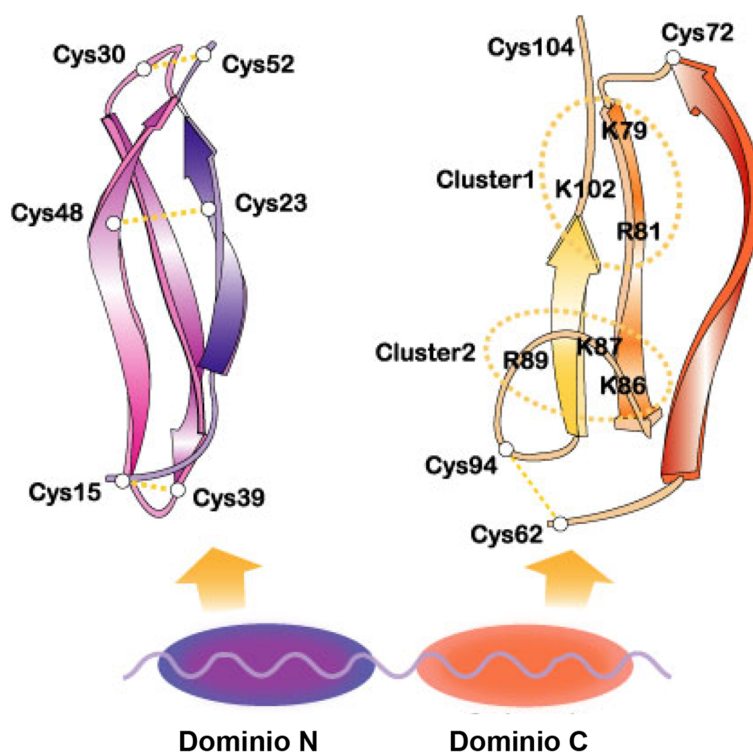


Figura I10. Estructura de la MDK. Representación esquemática de la estructura característica de los dominios N y C terminal de la proteína MDK humana. En la imagen se muestran los residuos de cisteína (Cys) entre los que se establecen puentes disulfuro así como las regiones o *clusters* presentes en el dominio C terminal y que permiten su interacción con heparina. Adaptado de Muramatsu et al., 2002.

Hasta el momento no se han identificado modificaciones post-traduccionales de MDK tales como fosforilaciones o glicosilaciones, aunque sí mutaciones en el *cluster 1* asociadas con una clara reducción en su capacidad para promover el crecimiento de neuritas (Maeda et al., 1999), así como un polimorfismo de nucleótido único (SNP) que se correlaciona con un incremento de hasta 5 veces en el riesgo de sufrir carcinoma colorrectal.

3.3 Funciones de la MDK

La MDK desempeña diferentes funciones en mamíferos relacionadas con el desarrollo, reproducción, inflamación, inmunidad y tumorigénesis. A nivel celular, la MDK promueve el crecimiento, la supervivencia, la migración, el crecimiento de neuritas y la síntesis proteica, participando en la regulación de diferentes sistemas:

1. Sistema nervioso y neurogénesis:

La MDK tiene una función esencial como factor neurotrófico, promoviendo la proliferación y la supervivencia de neuronas (Owada et al., 1999) y de células embrionarias (Yao et al., 2010) al estimular la progresión del ciclo celular e inhibir la apoptosis dependiente de las rutas de las MAPK y PI3K. La expresión de MDK favorece también el crecimiento, la supervivencia y la capacidad de formación de esferas de células progenitoras neurales mediante su interacción con proteoglicanos de heparán sulfato, contribuyendo a la neurogénesis (Zou et al., 2006), el crecimiento de neuritas, la determinación del destino celular y la migración de la glía radial (Muramatsu, 2011). También posee una función protectora ante la hipoxia en células madre embrionarias murinas, disminuyendo la producción de ROS (Lee et al., 2012). La MDK también participa en el desarrollo de neuronas dopaminérgicas y células de la retina, así como en la regulación de los efectos de determinadas drogas de abuso (Gramage et al., 2014; Herradón & Pérez-García, 2014; He et al., 2015).

2. Reparación e inflamación:

Altos niveles de expresión de MDK se han detectado en respuesta a un daño tisular inducido por alteraciones cardíacas, renales o isquémicas, así como en enfermedades inflamatorias como la esclerosis múltiple o la artritis reumatoide (Muramatsu, 2011). Además, la MDK promueve el desarrollo de la respuesta inflamatoria al favorecer la migración de leucocitos, neutrófilos y macrófagos, estimulando la síntesis de citoquinas y la supervivencia de células B (Sato et al., 2001; Horiba et al., 2006; Cohen et al., 2012).

3. Tumorigénesis:

La MDK se encuentra sobre-expresada en más de 20 tipos de tumores que incluyen los de colon, próstata, vejiga, gliomas, melanomas y neuroblastomas así como en carcinomas gástricos, esofágicos, pancreáticos, hepatocelulares, pulmonares o mamarios (Brien et al., 1996; Salama et al., 2006; Xu et al., 2009; Muramatsu 2014; Rawnaq et al., 2014). En muchos de estos casos, altos niveles de expresión de MDK se correlacionan con un peor pronóstico y menor supervivencia de los pacientes, como es el caso de los gliomas (Lorente et al., 2011; Ma et al., 2014; Cheng et al., 2014). La MDK contribuye a la tumorigénesis promoviendo el crecimiento y la supervivencia celular (Reiff et al., 2011; Tian et al., 2017), inhibiendo la apoptosis (Tong et al., 2007), estimulando la angiogénesis y linfangiogénesis (Choudhuri et al., 1997; Weckbach et al., 2012; Olmeda et al., 2017), la migración y la transición epitelio-

mesénquima (Huang et al. 2008; Zhao G et al., 2012) y la resistencia a distintos agentes quimioterapéuticos (Rebbaa et al, 2001; Kang et al., 2007; Lorente et al., 2011).

Puesto que la MDK se encuentra sobre-expresada en distintos tipos tumores, altos niveles de MDK se han detectado también en el suero o el plasma de pacientes con este tipo de patologías en comparación con pacientes sanos (Ikematsu et al., 2000). En muchas ocasiones además, la resección tumoral se asocia claramente a un descenso en los niveles de MDK circulantes, que vuelven a aumentar tras una recidiva, lo que permite considerar a este factor de crecimiento como un interesante biomarcador tumoral (Jones, 2014). Así por ejemplo, altos niveles de MDK en el suero y la orina de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico se pueden correlacionar con un peor pronóstico de estos pacientes (Xia et al., 2016), del mismo modo que su detección en otros tumores como los carcinomas de cabeza y cuello, hígado o tiroides se asocia con mayor malignidad, peor pronóstico y ausencia de respuesta al tratamiento, permitiendo monitorizar la progresión de la enfermedad (Zhu et al., 2013; Meng et al., 2015; Yamashita et al., 2016), permitiendo monitorizar la progresión de la enfermedad.

4. Otras funciones de la MDK:

La MDK también está implicada en otras funciones como la regulación de la condrogénesis, adipogénesis, presión arterial o reproducción, donde estimula la fertilización y maduración de oocitos (Muramatsu, 2014).

3.4 Posibles aplicaciones terapéuticas

La modulación de los niveles de MDK ha sido utilizada como estrategia terapéutica preclínica, especialmente como tratamiento frente a distintos tipos de tumores. El silenciamiento de la expresión de MDK (mediante la utilización de oligonucleótidos o *shRNAs* específicos) ha demostrado un efecto inhibitorio moderado sobre el crecimiento de tumores gástricos, prostáticos o hepatocelulares generados en ratones inmunodeficientes (Takei et al., 2001; Wang et al., 2007; Dai et al., 2009; Tian et al., 2017). Del mismo modo, moléculas inhibitoras de MDK, que podrían actuar directamente sobre la proteína mediante mecanismos aún no identificados, han sido eficaces a la hora de reducir el crecimiento de tumores generados con líneas celulares de cáncer de pulmón y carcinoma oral que presentan unos niveles incrementados de MDK (Hao et al., 2013; Masui et al., 2016).

Por otro lado, la administración de MDK exógena recombinante también se ha utilizado en casos de daño isquémico, cardíaco y óseo con la finalidad de promover la regeneración y supervivencia de estas células (Horiba et al., 2006).

3.5 Señalización celular dependiente de MDK

La MDK puede mediar todas estas funciones biológicas mediante la activación de distintos receptores transmembrana que conducen a la activación de múltiples vías de señalización. Aunque se han identificado numerosos receptores para MDK y PTN, lo cierto es

que hasta el momento ninguno de ellos puede considerarse específico. Hay que destacar además que la MDK sí ha mostrado afinidad de unión no solo por heparina, sino también por cadenas de heparán y condroitín sulfato, por lo que diferentes proteoglicanos han sido también descritos como posibles receptores de MDK (Kobayashi et al., 2013). De esta manera, se piensa que la MDK podría unirse a complejos integrados por distintos receptores y proteoglicanos en distintos contextos, lo que explicaría la variedad de respuestas biológicas exhibidas por este factor de crecimiento (Muramatsu, 2014; Sakamoto & Kadomatsu, 2012).

De forma general, las vías de señalización reguladas por la MDK incluyen la de PI3K/AKT, MAPK, ERK1/2, SRC y PKC, modificando también la expresión dependiente de factores de transcripción como NF κ B, HES-1 o STAT3. Las funciones antiapoptóticas de la MDK son dependientes de la inhibición de las CASPASAS 3 y 7 (Ohuchida et al., 2004) y del aumento de los niveles de expresión de proteínas BCL-2 (Tian et al., 2017), mientras que otras funciones como la diferenciación, el crecimiento de neuritas, la migración y la remodelación del citoesqueleto son dependientes de las vías de señalización acopladas al receptor PTPR ζ (Kadomatsu et al., 2013).

Los principales receptores a los que puede unirse la MDK son:

1. PTPR ζ : Receptor dual para MDK y PTN asociado a condroitín sulfato con actividad tirosina-fosfatasa intracelular implicado fundamentalmente en la estimulación de la supervivencia y migración neuronales (Sakaguchi et al., 2003). Tras la unión de MDK, el receptor dimeriza, promoviendo la inactivación del dominio fosfatasa intracelular, lo que resulta en un incremento de la fosforilación en residuos de tirosina de distintas proteínas como β -CATENINA, β -ADUCCINA y FYN, activando también rutas de señalización que promueven la supervivencia y migración celulares como PI3K/AKT, MAPK, SRC o PKC (Sakaguchi et al., 2003). Además de PTPR ζ , otros proteoglicanos como los sindecanos 1,3,4, el neuroglicano C o diferentes integrinas como α 4 β 1 and α 6 β 1 promueven el crecimiento de neuritas y la migración celular dependiente de MDK (Sakamoto & Kadomatsu, 2012).
2. LRP1 (*LDL receptor-related protein 1*): Receptor implicado en la endocitosis y posterior translocación nuclear de la MDK mediante su interacción con proteínas como la nucleolina y laminina, promoviendo la supervivencia celular mediante la inhibición de la apoptosis (Shibata et al., 2002) y regulando la duración de la respuesta intracelular mediante la internalización y posterior degradación lisosomal o proteasomal de la MDK (Suzuki et al., 2004). La unión de MDK a LRP1 favorece además el crecimiento celular independiente de anclaje en distintos tipos de tumores (Chen et al., 2007).
3. NOTCH-2: Favorece la inducción de la transición epitelio-mesénquima y promueve la resistencia a distintos agentes quimioterapéuticos, entre otros, en tumores gástricos y pancreáticos GÜNGÖR et al., 2011; Tian et al., 2017).

4. ALK: Receptor transmembrana con actividad tirosina-quinasa que participa en diversos procesos celulares como el control de la diferenciación neuronal, la mitogénesis y el desarrollo tumoral (Wellstein, 2012). Dado que ya se ha descrito la unión de MDK a ALK en diferentes contextos celulares, en particular en glioma, y que el objetivo de esta Tesis es el estudio del papel del eje MDK/ALK en la población de GICs, profundizaremos en las características del receptor ALK, con especial atención a su contribución oncogénica.

4. ALK

4. 1 Descripción general. Expresión génica y estructura proteica

El receptor ALK fue descubierto como parte de una proteína de fusión oncogénica integrada por la región N terminal de la proteína nucleofosmina (NPM) y la región citoplasmática de ALK como resultado de una translocación cromosómica presente en el linfoma anaplásico de células grandes (ALCL) (Morris et al., 1994), aunque su forma completa (y no como parte de una proteína de fusión) no fue clonada hasta 1997 (Morris et al., 1997).

El gen de *ALK* humano se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 2 (2p23.2), codificando un receptor con actividad quinasa que posee 1620 aminoácidos y un peso molecular de aproximadamente 180 KDa, aunque glicosilaciones posteriores de su extremo N terminal pueden hacer aumentar el peso molecular del receptor maduro hasta los 220 KDa (Iwahara et al., 1997). Estructuralmente, el receptor se divide en 3 regiones bien diferenciadas: un dominio N terminal extracelular, un dominio transmembrana y una región C terminal citosólica.

La región extracelular posee un péptido señal y múltiples dominios entre los que se encuentran dos dominios MAM (*Meprin/A5- protein/PTPmu*) implicados en funciones de adhesión celular, un dominio de unión a LDL (*low density lipoprotein*) y otro rico en glicinas cuya función es desconocida. Además, ALK presenta un dominio LBD (*ligand-binding domain*) que permite la interacción con los correspondientes ligandos. En este sentido, tanto FAM150A y FAM150B (Guan et al., 2015) como PTN (Stoica et al., 2001) y MDK (Stoica et al., 2002) han sido identificados como ligandos de ALK en vertebrados, aunque estudios posteriores han mostrado dudas acerca de la capacidad de estos 2 últimos ligandos para estimular ALK de forma directa (Moog-Lutz et al., 2005; Perez-Pinera et al., 2007). Otros ligandos para ALK como Jelly belly (implicado en el desarrollo del circuito visual) o HEN-1 (que participa en la respuesta sensorial) han sido identificados también en invertebrados como *Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans* respectivamente (Englund et al., 2003; Hallberg & Palmer, 2013).

Por su parte, la porción citoplasmática posee un dominio quinasa catalítico (Palmer et al., 2009; Wellstein, 2012), que presenta un 50% de homología con otros receptores con actividad tirosina quinasa. La unión del ligando induce la dimerización del receptor y su activación subsecuente mediante la trans-autofosforilación de residuos de tirosina en el segmento de activación A, desempeñando un papel clave la fosforilación inicial del residuo de Tyr 1278. La fosforilación posterior de otros residuos de tirosina del dominio citoplasmático que se encuentran fuera de este bucle sirve como lugar de anclaje para proteínas adaptadoras como IRS-1 (*insulin receptor substrate 1*) o GRB2 (*growth factor receptor bound protein 2*), que presentan dominios de unión SH2 (*Src homology 2*) y PTB (*phosphotyrosine-binding domain*), que permiten la activación de distintas cascadas de señalización intracelular.

Los niveles de ALK son elevados en diferentes regiones del cerebro humano y murino en desarrollo, pero su expresión disminuye drásticamente en el adulto. Así, la expresión de ALK en adulto queda restringida, en muy bajos niveles, a determinadas regiones del SNC así como a otros tejidos tales como el esófago, el estómago y el intestino delgado (Vernersson et al., 2006). Este patrón de expresión solapa en gran parte, tanto en el tiempo como en el espacio, con el que poseen sus ligandos MDK y PTN, con lo que se ha sugerido que ALK desempeña un papel importante en el desarrollo y la función del sistema nervioso favoreciendo el crecimiento y la supervivencia de distintas poblaciones neuronales tras la activación dependiente de estos ligandos (Mi et al., 2007; Yanagisawa et al., 2010). ALK se ha asociado también con el crecimiento de neuritas, el control de la diferenciación neuronal (Motegi et al., 2004), y al igual que ocurre con sus correspondientes ligandos, también con procesos patológicos como el cáncer como veremos a continuación.

4.2 Señalización intracelular dependiente de ALK

Desde el punto de vista de la señalización intracelular, la activación de ALK conduce a la sobre-estimulación de las vías de señalización que habitualmente se encuentran corriente abajo de distintos receptores con actividad tirosina-quinasa como las vías PI3K/AKT y RAS-MAPK (implicadas principalmente en el control de la proliferación y la supervivencia celular, así como de la capacidad invasiva o metastática) o la vía de STAT3, que favorece la expresión de genes como *BCL-2*, *BIM* o *HIF-1 α* relacionados con la supervivencia, la progresión celular y la señalización antiapoptótica (Hallberg & Palmer, 2013). Del mismo modo, ALK regula la activación de otras proteínas y vías de señalización como el complejo MTORC1 (fundamentalmente mediante la activación de ERK y AKT) o la PLC- γ , lo que también se ha asociado a la progresión tumoral (Chiarle et al., 2008; Ardini et al., 2010)(Figura I11).

Aunque en la mayoría de casos analizados ALK se encuentra localizado en la membrana o el citoplasma, desde donde puede activar las distintas rutas de señalización descritas, formas mutadas y no mutadas del receptor pueden también translocarse al núcleo e interactuar con proteínas como NIP4 para regular la expresión de distintos genes implicados en la progresión tumoral como *MYCN*, *MMP9*, *CDKN2A* o *HIF1 α* (Hallberg & Palmer, 2013).

4.3 Papel de ALK en cáncer

En línea con el papel pro-tumoral descrito tras el descubrimiento de su integración en la proteína de fusión NPM-ALK en ALCL, se han identificado diferentes mecanismos de desregulación oncogénica del receptor ALK. Así, se han detectado mutaciones puntuales en su dominio tirosina-quinasa que permiten la activación constitutiva en distintos tipos de tumores como los meduloblastomas, los tumores tiroideos y en cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), donde son habituales también las amplificaciones del receptor (Hallberg & Palmer, 2013). Igualmente se ha descrito la existencia de hasta 22 genes diferentes que podrían translocarse con ALK para generar proteínas de fusión, entre las que destaca por su

frecuencia y consecuencias clínico-patológicas, la integrada por EML4 (*echinoderm microtubule associated protein like 4*) y ALK, identificada en tumores de mama, colon y pulmón (Chiarle et al., 2008). Además, la identificación de sitios alternativos de inicio de la transcripción del gen de *ALK* ha permitido identificar la existencia de una isoforma denominada *ALK^{ATL}*, cuya expresión está asociada con el desarrollo de algunos tipos de tumores como el melanoma (Wiesner et al., 2015).

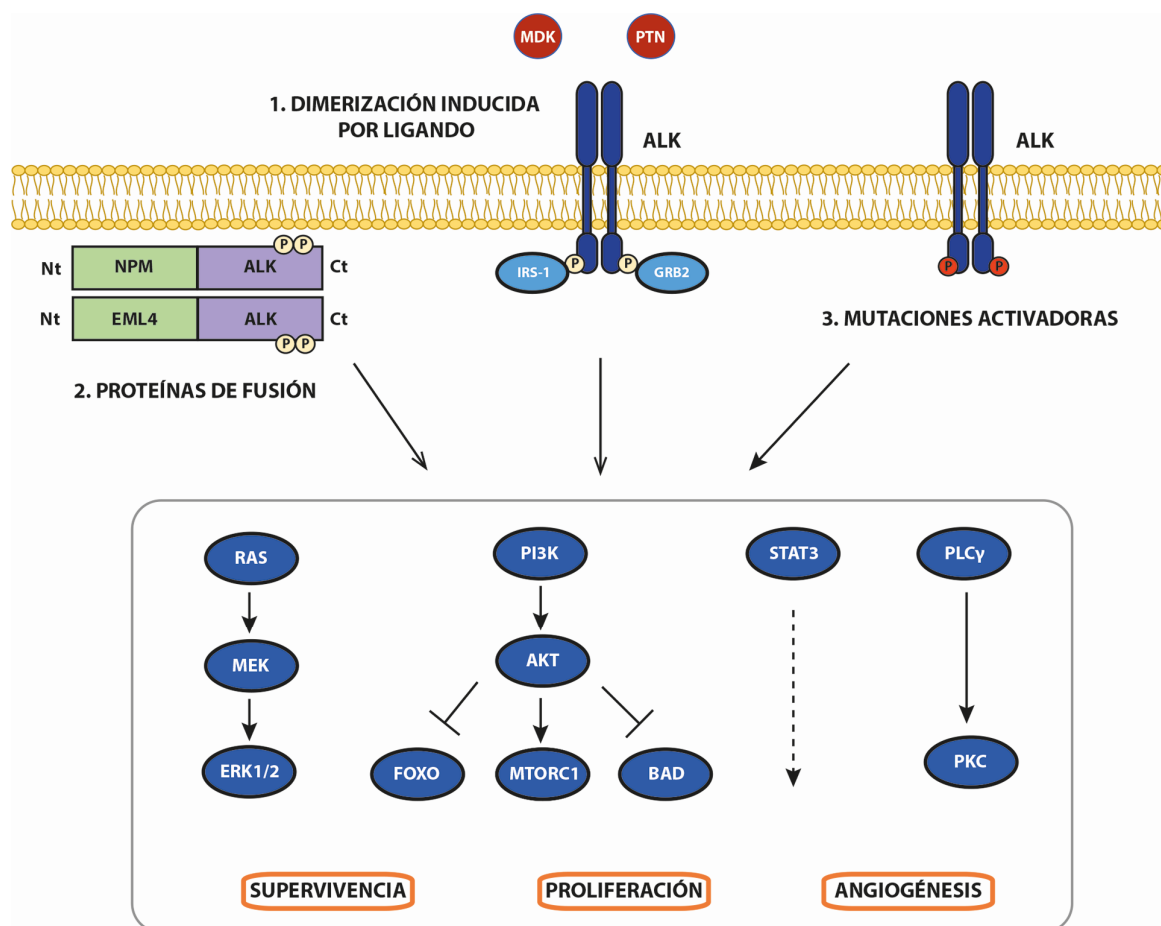


Figura I11. Mecanismos de activación de ALK en cáncer. La activación del receptor ALK no mutado tiene lugar tras la unión de sus correspondientes ligandos (MDK y PTN), que inducen su dimerización y autofosforilación en residuos específicos de Tyr. Igualmente, ALK puede formar parte de proteínas de fusión con NPM o EML4, o bien sufrir mutaciones activadoras en su dominio catalítico, que conducen a su activación constitutiva. En todos los casos, se produce la estimulación de diversas rutas de señalización que promueven la supervivencia, la proliferación celular o la angiogénesis y que contribuyen a la progresión tumoral.

Por su parte, unos niveles incrementados del receptor ALK no mutado también se han detectado en líneas celulares derivadas de tumores de mama y ovario, rhabdomyosarcoma, neuroblastoma, melanoma o glioma (Dirks et al., 2002; Ren et al., 2012). Del mismo modo, también se ha encontrado un incremento en los niveles de expresión de ALK (mRNA y proteína) en muestras procedentes de pacientes con glioma en comparación con muestras procedentes de tejido sano no tumoral (Powers et al., 2002; Chiba et al., 2017). Diversos estudios estiman que hasta un 70% de los pacientes con GBM muestran una sobre-expresión del receptor ALK, aunque existen datos contradictorios en cuanto al patrón de localización

subcelular y las consecuencias clínico-patológicas de esta sobre-expresión (Stylianou et al., 2009; (Zhang I et al., 2015; Chiba et al., 2017; Karagkounis et al., 2017). La sobre-activación del receptor ALK no mutado tras la unión de sus correspondientes ligandos (PTN y MDK) promueve la proliferación y la supervivencia de precursores mieloides murinos (Kuo et al., 2007) así como de células tumorales de mama (Finak et al., 2008), neuroblastoma (Reiff et al., 2011), osteosarcoma (Wu et al., 2017), hepatocarcinoma celular (Sun et al., 2017) y especialmente en GBM (Powers et al., 2002; Stoica et al., 2002; Grzelinski et al., 2009), donde promueve fundamentalmente la vascularización, el fenotipo *stem* y la resistencia a distintos agentes antitumorales (Lorente et al., 2011; Koyama-Nasu et al., 2014; Zhang L, et al., 2015). Por último, hay que destacar que, con la excepción de casos concretos (Aghajan et al., 2016), no se han encontrado mutaciones puntuales, amplificaciones génicas o generación de proteínas de fusión integradas por ALK en GBM (Karagkounis et al., 2017; Chiba et al., 2017).

4.4 ALK como diana terapéutica

La caracterización de ALK como un receptor implicado en la oncogénesis ha captado la atención como posible diana terapéutica, lo que ha permitido el desarrollo de moléculas dirigidas a inhibir su actividad tirosina-quinasa. En 2011, el crizotinib (Xalkori, Pfizer), un inhibidor de la actividad tirosina-quinasa de ALK y de otros receptores con actividad tirosina-quinasa como MET y ROS-1 implicados en la progresión tumoral, fue aprobado para su uso en pacientes con NSCLC que mostraban alteraciones en ALK, debido a los prometedores efectos observados en estudios clínicos en fase I y II (Camidge et al., 2012). Sin embargo, el tratamiento prolongado con este inhibidor se ha asociado a la generación de resistencias a su efecto en más de un 30% de estos pacientes debido a la existencia de mutaciones puntuales secundarias en ALK, a la activación de rutas de señalización alternativas (tales como la vía del EGFR o el eje AKT/MTORC1) capaces de eludir la inhibición de ALK por crizotinib, así como amplificaciones del propio receptor (Katayama et al., 2012). Por ese motivo, se han desarrollado inhibidores de la actividad tirosina quinasa de ALK de segunda (ceritinib y alectinib) y tercera generación (lorlatinib y bargatinib) que han demostrado una buena eficacia antitumoral ante la presencia de este tipo de mutaciones (Katayama et al., 2014; Shaw et al., 2016). Estos inhibidores se caracterizan además por presentar una mayor especificidad en la inhibición de ALK y una elevada capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica, lo que los hace especialmente atractivos para el tratamiento de las metástasis cerebrales que se produce en hasta un 30% de pacientes con NSCLC (Rothenstein & Chooback, 2018). De entre todos esos inhibidores cabe destacar el lorlatinib, un inhibidor dual de ALK y ROS1 terapéuticamente eficaz frente a todas las mutaciones secundarias descritas (Zou et al., 2015a).

5. Autofagia

La homeostasis celular depende en gran medida de un correcto balance entre los procesos de síntesis y degradación de los diferentes componentes celulares. En este proceso interviene la macroautofagia (de aquí en adelante autofagia), un proceso celular conservado a lo largo de la evolución que se activa ante determinados estímulos para internalizar, en vesículas de doble membrana llamadas autofagosomas, componentes del citoplasma como proteínas y orgánulos dañados. Estas vesículas se fusionan con la membrana del lisosoma, donde se promueve la degradación del contenido del autofagosoma mediante la acción de las hidrolasas presentes en el lisosoma.

Cuadro 2: Aunque la macroautofagia es la forma mejor caracterizada y estudiada de autofagia, se ha descrito la existencia de al menos otros 2 tipos. Así, los componentes citosólicos a degradar pueden ser directamente capturados mediante la invaginación de la membrana lisosomal en un proceso conocido como microautofagia. Además, las proteínas y orgánulos también pueden entrar en el lisosoma mediante una translocación específica mediada por chaperonas (CMA), en la que las proteínas a degradar deben presentar un pentapéptido (KFERQ) reconocido por la chaperona HSC70, que lo dirige a la membrana lisosomal para que interaccione con la proteína LAMP2A (*lysosome-associated membrane protein type 2A*), permitiendo su translocación al interior de este orgánulo para su degradación posterior (Tekirdag & Cuervo, 2018). Aunque inicialmente se pensó que la CMA era la única forma de degradación selectiva por autofagia, al menos una fracción de las proteínas degradadas durante la macroautofagia puede dirigirse selectivamente a los autofagosomas mediante la interacción directa con proteínas implicadas en la formación del fagóforo. Entre ellas destacan MAP1LC3A (LC3, a través de la interacción con dominios *LIR*, *LC3-interacting region*) y p62, capaz de reclutar proteínas ubiquitinadas al autofagosoma a través de su dominio UBD (*ubiquitin-binding domain*) (Zaffagnini & Martens, 2016).

5.1 Desarrollo de la macroautofagia. Etapas del proceso autofágico

Desde la detección de autofagosomas por microscopía electrónica en la década de 1950, multitud de estudios en diferentes organismos han permitido la identificación de hasta 31 genes relacionados con autofagia en levaduras, denominados ATG (*autophagy-related genes*). Posteriormente, numerosos homólogos de ATG han sido identificados y caracterizados en eucariotas (reforzando la idea de que la autofagia es un proceso muy conservado entre las distintas especies), donde participan en las distintas etapas que constituyen la activación del flujo autofágico.

La autofagia generalmente se encuentra activa en niveles basales en la célula, asegurando la continua eliminación y el reciclaje de elementos innecesarios o potencialmente dañinos para ella y actuando como un sistema de control de calidad intracelular que mantiene la integridad de proteínas y orgánulos. Sin embargo, multitud de estímulos como la privación de nutrientes, el estrés metabólico y celular, la hipoxia o el tratamiento con

rapamicina estimulan el desarrollo de la respuesta autofágica, que como se resume en la **Figura I12**, consta de 3 etapas:

1. Inducción de autofagia:

De forma resumida, el descenso de los niveles energéticos en la célula (ATP) o la privación de nutrientes o aminoácidos estimula la activación de la proteína AMPK y la inhibición del complejo MTORC1, un regulador negativo clave del proceso autofágico. De esta manera se favorece la activación de ULK1, que promueve la formación y estabilización de un complejo de iniciación integrado, entre otras proteínas, por VPS34 (PI3KC3, una PI3K de clase III) y BECLIN1, y que se encuentra regulado también por la propia AMPK y proteínas antiapoptóticas como BCL-2. El incremento subsecuente de los niveles de PIP₃ es reconocido por efectores tempranos de la autofagia, lo que contribuye al aislamiento de membranas procedentes del retículo endoplásmico (en especial de una estructura derivada de este orgánulo rica en PIP₃ denominada omegasoma), el aparato de Golgi o los endosomas, generando estructuras de doble membrana conocidas como fagóforos (Green & Levine, 2014; Galluzzi et al., 2017).

2. Elongación:

En este proceso interviene un sistema similar al de ubiquitina integrado por 2 complejos que tienen como protagonistas a distintas proteínas ATG:

En el primero de ellos, la proteína análoga a la ubiquitina ATG12 es activada por ATG7 (con función de enzima E1 activador) y posteriormente transferida a ATG10 (proteína que desempeña el papel de enzima E2 en el proceso de conjugación), lo que permite su unión covalente a la proteína diana, ATG5.

De forma similar, la proteína ATG8 (LC3) es procesada proteolíticamente por ATG4 generando la forma LC3-I. Esta proteína es activada por ATG7 (E1), transferida a ATG3 (E2) y finalmente conjugada con la fosfatidiletanolamina (PE) para dar lugar a LC3-II, en un proceso facilitado por el complejo ATG5-ATG12 recién generado. Este complejo actúa como un sistema E3-ligasa capaz de reclutar e integrar a LC3-II en la membrana del fagóforo, favoreciendo la generación de los autofagosomas (Hanada et al., 2007). Esta forma lipidada de LC3 se correlaciona con el tamaño del autofagosoma y se considera un buen marcador de la activación de autofagia (Kabeya et al., 2000), a diferencia del complejo ATG5-ATG12, que solo aparece de forma transitoria durante la formación del autofagosoma.

3. Maduración del autofagosoma y fusión con el lisosoma:

La maduración del autofagosoma se completa mediante su fusión con el lisosoma, un proceso que requiere de la participación de proteínas como LAMP-1 y la GTPasa RAB7. Se forma así una vesícula de una sola membrana, denominada autofagolisosoma, donde tiene lugar la degradación de los componentes seleccionados mediante la acción de hidrolasas lisosomales como las proteasas A y B y las catepsinas B y D. De esta manera, los aminoácidos

generados pueden ser reciclados y utilizados para la generación de macromoléculas y para síntesis de energía mientras que las proteínas u orgánulos dañados o distintos patógenos intracelulares son eliminados, restringiendo el daño celular (Green & Levine, 2014).

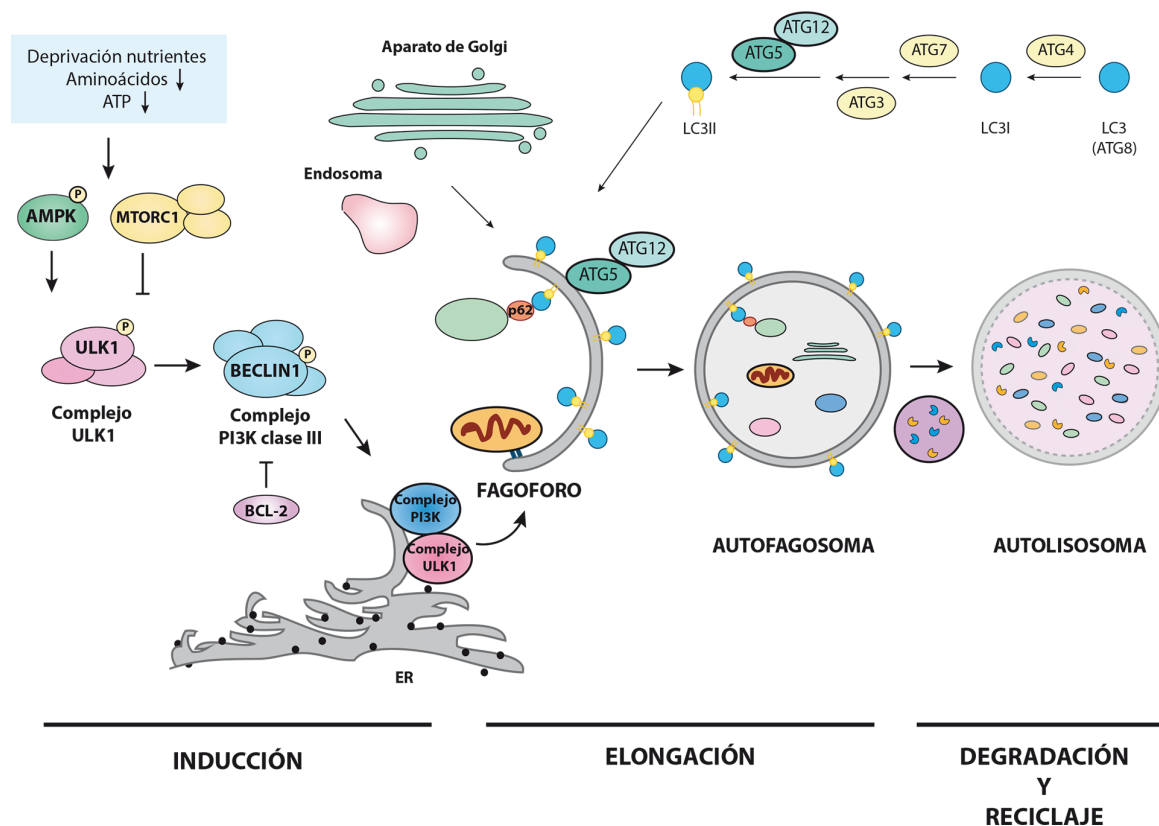


Figura I12. Etapas de la autofagia. Resumen esquemático de las distintas etapas de la autofagia y los principales complejos proteicos implicados en su desarrollo. Adaptado de Green & Levine 2014.

Distintos inhibidores que actúan en diferentes puntos clave de la ruta de señalización autofágica han sido desarrollados hasta el momento, permitiendo modular la activación dinámica de esta vía. Entre ellos destacan los inhibidores de la PI3K de clase III como la 3 metiladenina (3MA) y la wortmanina, inhibidores de MTORC1 como la rapamicina, torina y temsirolimus, así como aquellos que actúan en las etapas finales de la autofagia como la hidroxiclороquina y la bafilomicina A (que inhiben la acidificación lisosomal) o el E64D y la pepstatina A (que inhiben las proteasas lisosomales). Algunos de estos compuestos se encuentran en fase de ensayos clínicos para el tratamiento de distintas patologías como el cáncer (Pasquier, 2016).

5.2 Papel dual de la autofagia en cáncer

La participación clave de la autofagia en la regulación de la homeostasis hace que alteraciones de este complejo proceso celular contribuyan al desarrollo de numerosas enfermedades como la neurodegeneración, las alteraciones cardiovasculares o el cáncer (Galluzzi et al., 2015). En este sentido, el papel desempeñado por la autofagia en el inicio y la progresión tumoral es realmente controvertido.

Por un lado, se piensa que la autofagia posee un **efecto oncosupresor** en situaciones fisiológicas normales puesto que muchas proteínas con un elevado potencial oncogénico tales como AKT, PI3K o MTORC1 inhiben la autofagia (Degenhardt et al., 2006), mientras que supresores tumorales como PTEN o el eje LKB1 (*Liver kinase B1*)-AMPK estimulan la autofagia (Liang et al., 2007). Además, las células tumorales suelen presentar unos bajos niveles de autofagia, al menos en parte porque tienen sobre-activadas muchas rutas de señalización reguladas por factores de crecimiento tales como EGFR o HER2 (*Human epidermal growth factor receptor 2*), que convergen en rutas canónicas que inhiben este proceso (Galluzzi et al., 2015). En línea con esta idea, la deficiencia o alteración de genes esenciales para el desarrollo de la autofagia como *AMBRA1*, *BECLIN1*, *ATG5* o *ATG7* favorece el desarrollo y la progresión de distintos tipos de tumores (Qu et al., 2003; Takamura et al., 2011; Rao et al., 2014), del mismo modo que la expresión ectópica de *ATG5* reduce la habilidad formadora de colonias de distintas líneas celulares de melanoma (Liu et al., 2013). Además, un descenso en los niveles de proteínas como *BECLIN1* o *ATG5* se han correlacionado con peor pronóstico en pacientes con distintos tipos de tumores (Jiang et al., 2012; Liu et al., 2013).

Desde el punto de vista molecular, la autofagia evita en muchos casos la acumulación de proteínas mal plegadas, disfuncionales o con una elevada capacidad oncogénica (Mathew et al., 2009), así como orgánulos (fundamentalmente mitocondrias y peroxisomas) alterados capaces de inducir estrés oxidativo e inestabilidad genómica y que contribuyan así al desarrollo tumoral (Galluzzi et al., 2015). Igualmente, la autofagia puede contribuir a la senescencia y la apoptosis de células pre-tumorales que han comenzado a proliferar de forma descontrolada (Elgendy et al., 2011). Por último, Michaud y colaboradores han publicado que la autofagia podría interferir en el mecanismo antitumoral de inmunovigilancia ejercido por las células del microambiente tumoral (Michaud et al., 2011).

Sin embargo, también se ha descrito la existencia de una autofagia **pro-oncogénica**, especialmente en tumores ya establecidos, así como en las etapas más avanzadas de la progresión tumoral. Esta autofagia puede conferir una ventaja selectiva a las células tumorales mediante la obtención de la energía generada por la degradación de componentes celulares en respuesta a condiciones ambientales adversas o estresantes como la privación de nutrientes o la hipoxia (Kanzawa et al., 2005). Así por ejemplo, un elevado flujo autofágico se ha asociado con un fenotipo más invasivo y metastásico así como con un peor pronóstico en cáncer de mama, melanoma (Lazova et al., 2012) o en carcinoma renal (Mikhaylova et al., 2012). Asimismo, defectos en la autofagia (tales como la inactivación de *BECLIN1*, *ATG5* o *ATG7*) en distintos tipos de tumores como el carcinoma pancreático o pulmonar pueden frenar el crecimiento y el potencial metastásico de estas células (Peng et al., 2013; Rosenfeldt et al., 2013; Rao et al., 2014). Los resultados encontrados por Rosenfeldt y colaboradores muestran también que la supresión de autofagia en combinación con la deficiencia de *TP53* acelera la iniciación y progresión tumoral mediante una elevación de la función mitocondrial y una alta tasa metabólica, sugiriendo que mutaciones en *TP53* pueden determinar el papel

de la autofagia, al menos, en tumores pancreáticos. Al igual que en otros tipos de tumores, el papel de la autofagia en glioma no está del todo claro, ya que un aumento en la expresión de genes de autofagia como *LC3B* o *BECLIN1* se ha correlacionado tanto con buen como con mal pronóstico en pacientes con GBM (Pirtoli et al., 2009).

Por último, tanto la radioterapia como distintos agentes quimioterapéuticos promueven un aumento del flujo autofágico en las células tumorales, sugiriendo que este proceso desempeña un papel relevante desde el punto de vista terapéutico. Sin embargo, no está claro qué consecuencias tiene esta activación de la autofagia, ya que su inhibición genética o farmacológica en células tumorales se ha asociado tanto con una reducción de la eficacia como con una mayor sensibilización a estas terapias tanto *in vitro* como *in vivo* (Ko et al., 2014; Levy et al., 2014). No es distinto el caso de los gliomas, donde los 2 tratamientos estándar frente a este tipo de tumores (TMZ y radioterapia) pueden inducir tanto una autofagia protectora (Katayama et al., 2007; Lin et al., 2012), que contribuye especialmente a la supervivencia de las GICs (Lomonaco et al., 2009; Ye et al., 2013), como citotóxica (Kanzawa et al., 2004; Zhang J et al., 2015). Actualmente, la combinación de TMZ con inhibidores de la autofagia como la hidroxicloroquina, se encuentra en fase de ensayos clínicos para el tratamiento del GBM (Rosenfeld et al., 2014). Cabe destacar además que otros agentes con propiedades antitumorales como el trióxido de arsénico (Kanzawa et al., 2005), los cannabinoides (Salazar et al., 2009), antagonistas dopaminérgicos (Dolma et al., 2016) o incluso virus oncolíticos (Alonso et al., 2008) han demostrado ser capaces de inducir una autofagia que promueve la muerte de células de glioma, algunos de ellos además potenciando el efecto citotóxico de la TMZ (Torres et al., 2011; Balvers et al., 2015).

En resumen, la capacidad de la autofagia para ser regulada por diversos estímulos y distintas rutas de señalización en contextos celulares muy distintos, así como la modulación que ésta puede ejercer sobre las propiedades inmunogénicas de los tumores, puede explicar el papel dual exhibido por la autofagia en la progresión tumoral y en la respuesta a distintos tratamientos antitumorales (Rosenfeldt et al., 2013; Maycotte et al., 2014).

OBJETIVOS

Como se indica en la Introducción de la presente Tesis Doctoral, datos previos obtenidos por nuestro grupo de investigación indican que la presencia de niveles elevados de MDK se correlacionan con resistencia a la acción antitumoral de los cannabinoides en gliomas. Más aún, elevados niveles de este factor neuro-trófico se asocian con una menor supervivencia de los pacientes con GBM. Puesto que uno de los mecanismos que determina la elevada agresividad y resistencia a terapia de estos tumores es la presencia de una población de células iniciadoras de gliomas (GICs), en esta Tesis Doctoral se postula la **hipótesis** de que la MDK es uno de los factores responsables de mantener la población de GICs en GBM, así como de determinar su resistencia a distintas terapias.

El **objetivo global** de esta Tesis Doctoral es por tanto analizar el papel ejercido por el eje MDK/ALK en la población de GICs, así como los mecanismos moleculares que median dicha regulación. Asimismo, este trabajo está encaminado a desarrollar estudios preclínicos que permitan sentar las bases de nuevas estrategias terapéuticas basadas en la eliminación de las GICs y que permitan mejorar la eficacia de las terapias que se utilizan actualmente en el tratamiento del GBM.

Este objetivo global puede desglosarse en los siguientes objetivos específicos:

- Objetivo 1: Optimización de la terapia antitumoral frente al GBM basada en el uso de cannabinoides

Con el objetivo de aportar nuevas estrategias para el tratamiento del GBM, estudiaremos el efecto ejercido por la combinación de TMZ y cannabinoides que poseen distintas proporciones de THC y CBD sobre cultivos enriquecidos en GICs tanto *in vitro* como *in vivo*.

- Objetivo 2: Análisis del papel del eje MDK/ALK en la regulación de la auto-renovación y la capacidad tumorigénica de las GICs

Con la finalidad de determinar la relevancia del eje MDK/ALK en las GICs, llevaremos a cabo experimentos destinados a evaluar la capacidad de auto-renovación y la capacidad tumorigénica de estas células tras el bloqueo genético o farmacológico de MDK y ALK utilizando distintas aproximaciones experimentales.

- Objetivo 3: Análisis del mecanismo de acción del eje MDK/ALK en GICs

En este tercer objetivo, profundizaremos en los mecanismos moleculares que median los efectos producidos por la inhibición del eje MDK/ALK en estas células iniciadoras de tumores, prestando especial atención al papel ejercido por factores de transcripción pertenecientes a la familia de proteínas SOXs.

OBJETIVOS

- Objetivo 4: Análisis de la eficacia terapéutica del tratamiento con inhibidores del eje MDK/ALK individualmente o en combinación con otros agentes antitumorales en modelos preclínicos de GBM

Finalmente, con el objetivo de evaluar la relevancia terapéutica del eje MDK/ALK, analizaremos el efecto antitumoral producido por la combinación de inhibidores farmacológicos de este eje en combinación con otros agentes antitumorales como la TMZ y los cannabinoides tanto *in vitro* como en modelos animales de GBM.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Reactivos

1.1 Moléculas moduladoras del eje MDK/ALK

La MDK recombinante purificada (denominada MDK exógena, MDK ex.) y los anticuerpos monoclonales neutralizantes de la MDK humana fueron donados por la empresa farmacéutica CellMid (Nueva Gales del Sur, Australia). Ambos reactivos se resuspendieron en PBS. A lo largo de la presente Tesis se utilizaron 4 anticuerpos neutralizantes de MDK distintos: IP9 e IP10 (anticuerpos murinos diseñados frente al dominio N terminal de la MDK humana y que de forma abreviada se denominan MDK Ab.) e IP14 y CAB102 (anticuerpos diseñados frente al dominio C terminal de MDK, de los cuales el CAB102 se encuentra humanizado). Igualmente se utilizaron 3 inhibidores distintos de la actividad tirosina-quinasa del receptor ALK: NVP-TAE 684 (TAE), sintetizado por Sergey A. Lakatos en el Instituto de Nuevos Antibióticos Gause (Moscú, Rusia) o comprado en MedChem Express (#HY-10192, Sollentuna, Suecia) así como crizotinib y lorlatinib, amablemente cedidos por Pfizer (Nueva York, EE. UU.). Todos ellos se diluyeron en dimetilsulfóxido (DMSO, Panreac, Darmstadt, Alemania).

1.2 Cannabinoides

El THC y CBD fueron adquiridos a la empresa THC Pharm Company (Frankfurt, Alemania). Los extractos botánicos enriquecidos en THC (THC-BDS, que contiene un 67,6% de THC p/p, un 0,3% de CBD p/p y <1,7% p/p de otros compuestos cannabinoides) y CBD (CBD-BDS, que contiene un 65,4% de CBD p/p, un 3,2% de THC p/p y <1,7% de otros compuestos cannabinoides) fueron cedidos por GW Pharmaceuticals (Salisbury, Reino Unido). Los cannabinoides se obtuvieron como una resina, se disolvieron en etanol a una concentración de 100 mg/ml y se almacenaron a -20°C. Las cantidades requeridas de cada componente se secaron, se pesaron y se diluyeron en DMSO.

1.3 Otros compuestos

Tanto la TMZ (ref. 5006090001) como la lactacistina (ref. 426100) fueron adquiridos a la empresa Merck (Darmstadt, Alemania) mientras que los inhibidores de cisteín-proteasas E64D (ref. BML-PI107-005) y de aspartil-proteasas pepstatina A (ref. 260-085-M025) se obtuvieron de Enzo Life Science (Farmingdale, Nueva York, EE.UU.). Todos ellos se resuspendieron en DMSO. Por su parte, la doxiciclina (Dox., ref. D9891) y la puromicina (ref. P4850) se adquirieron en Sigma (St. Louis, MO, EE. UU.) y se resuspendieron en DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) y PBS, respectivamente.

2. Cultivos celulares

Los cultivos enriquecidos en células iniciadoras de gliomas (GICs utilizando el acrónimo de su denominación en inglés "*Glioma Initiating Cells*") proceden de muestras obtenidas durante la resección quirúrgica del tumor en pacientes diagnosticados con GBM.

Los cultivos denominados GH2 y GH11 se obtuvieron del biobanco del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO, Madrid, España), el cultivo 12012 fue cedido por la Dra. Pilar Sánchez (Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España) y procede de un paciente operado en el Hospital 12 de Octubre (Madrid, España), mientras que el cultivo HCO1 se obtuvo a partir de la muestra de un paciente del Hospital Clínico San Carlos (Madrid, España). En todos los casos, la obtención de muestras contó con la aprobación de los comités éticos de cada institución, así como del comité de ética de la Universidad Complutense siguiendo los principios recogidos en la Declaración de Helsinki. Todos los participantes del estudio firmaron el correspondiente consentimiento informado.

De forma resumida, las muestras de tumores se disociaron primero mecánicamente y posteriormente de forma enzimática mediante incubación con colagenasa tipo Ia de *Clostridium histolyticum* (Sigma #C9722) a una concentración de 0,12 mg/ml durante 2 horas a 37°C. Tras hacer pasar la muestra por filtros de nylon de 100 µm (Millipore ref.352360, Burlington, MA, EE. UU.) con la finalidad de eliminar los restos de tejido disgregado, la suspensión celular obtenida se centrifugó a 1600 rpm durante 7 minutos. El *pellet* de células resultante se sembró en flasks F-25 a una densidad de 50.000 células/ml en **medio completo de GICs** que contiene DMEM:Ham's F-12 (Lonza, Basilea, Suiza) suplementado con penicilina-estreptomicina (1%), tampón HEPES 5 mM (Lonza), ultraglutamina 2 mM (Lonza), EGF (20 ng/ml), FGFb (20 ng/ml) (los dos adquiridos a Gibco, Carlsbad, USA), sal sódica de heparina (2 µg/ml)(Sigma), B27 (1%) (Invitrogen, Carlsbad, USA) y factor inhibidor de leucemia LIF (1 µg/ml)(Millipore), lo que permitió su crecimiento como neuroesferas.

Una vez que las esferas alcanzaron el tamaño apropiado (5-10 días dependiendo de la tasa proliferativa de cada cultivo) se sub-cultivaron utilizando un método de disgregación mecánica y/o enzimática. Para ello, las células se centrifugaron a 1100 rpm para ser posteriormente disgregadas mecánicamente (mediante resuspensión en 1 ml de medio completo de GICs) o enzimáticamente [(mediante resuspensión en 100 µl de acutasa (Sigma #A6964)] antes de volver a ser sembradas para mantenimiento celular, congelación en un medio específico libre de suero (IBIDI, Munich, Alemania) o para la realización de los distintos experimentos. En este último caso, las células se sembraron a una densidad de entre 50.000 y 100.000 células/flask F-25 (a no ser que se indique lo contrario en el correspondiente pie de figura). En todos los experimentos se utilizaron células que tenían menos de 20 pases.

Con la finalidad de utilizar cultivos celulares de bajo número de pases que permitan mantener la expresión de marcadores característicos de células progenitoras neurales, estas células se inyectaron subcutáneamente en el flanco derecho de ratones inmunodeprimidos (ver el apartado "Modelos animales" en esta sección de "Materiales y métodos" para más detalles acerca de la inyección) y cuando alcanzaron un volumen de 1400 mm³, se extrajeron para ser disgregados siguiendo el mismo protocolo descrito para las muestras obtenidas de biopsias de pacientes. La diferenciación de los cultivos de GICs se indujo mediante su cultivo en medio DMEM en presencia de suero (FBS). Por su parte, tanto la línea celular de glioma

humano U87MG (HTB-14™) como las células HEK293T (CRL-11268™) y DF-1 (CRL-12203™) se obtuvieron de la *American Type Cell Culture Collection* (ATCC, Manassas, Virginia, EE.UU.) y se cultivaron en un medio DMEM suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10% y penicilina-estreptomicina al 1%. Los cultivos de U87-GICs no adherentes se generaron mediante la incubación de la línea celular U87MG en medio completo de GICs en ausencia de suero. Todos los cultivos se incubaron a 37°C y 5% de CO₂.

En los experimentos *in vitro*, la incubación con los correspondientes controles o vehículos (VEH) contenían la misma cantidad de DMSO o PBS adicionado a las células tratadas, sin que este tratamiento ocasionara ningún efecto significativo en cualquiera de los parámetros determinados a lo largo de esta tesis.

2.1 Determinación de la capacidad de crecimiento de esferas en condiciones no clonales/Determinación del número total de células en cultivos de GICs

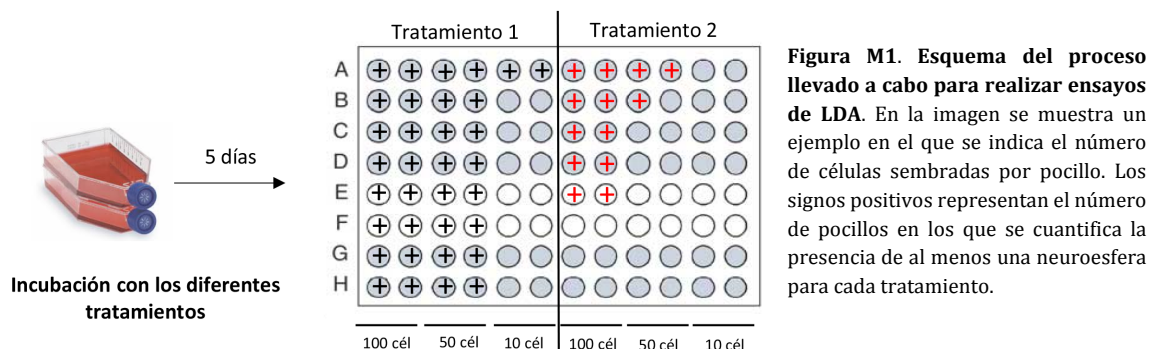
Para determinar el número total de células procedentes de las esferas formadas en presencia o ausencia de los distintos tratamientos, los cultivos de GICs se sembraron en flasks F-25 a una densidad de 10⁴ células/ml (pase 0, P0) y se incubaron con los distintos tratamientos durante 5-10 días consecutivos dependiendo del cultivo utilizado. Las esferas formadas se disociaron, se contó el número total de células (pase 1, P1) y éstas se sembraron a la misma densidad y se incubaron nuevamente con los correspondientes tratamientos durante 5-10 días adicionales. Este procedimiento se repitió durante 2 pases consecutivos (pase 2, P2). Los datos se representan en cada gráfica como número total de células contadas tras la disgregación de las neuroesferas en cada pase, y se expresan como el incremento en el número de células con respecto al número de células sembradas en el pase 0 (P0) ± SEM (error estándar de la media).

2.2 Determinación de la capacidad de auto-renovación (ensayos de dilución límite, LDA)

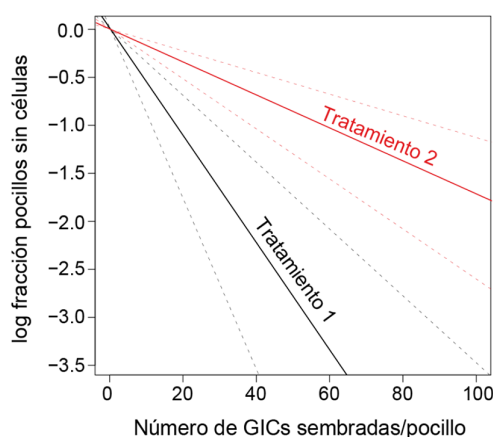
Los cultivos de GICs se sembraron e incubaron con los distintos tratamientos siguiendo el mismo protocolo citado anteriormente. Tras 5 días de tratamiento, las esferas se disgregaron y se sembraron en pocillos de placas p96 a diferentes densidades comprendidas entre 100 y 10 células/pocillo (**Figura M1**). 1 o 2 semanas después (dependiendo del cultivo estudiado), se evaluó la formación de neuroesferas, de forma que los pocillos en los que se observó la presencia de al menos una neuroesfera fueron considerados positivos. Estos resultados se procesaron utilizando el software específico ELDA (acrónimo del nombre de este ensayo en inglés *Extreme Limiting Dilution Assay*)(Hu & Smyth, 2009), que proporciona una representación gráfica como la que se muestra en la **Figura M2** y en la que la pendiente de cada recta (representada como una línea continua) corresponde a la fracción de células con la capacidad para generar nuevos cultivos de esferas. De esta forma, una menor pendiente (como la que en el ejemplo representado en la **Figura M2** corresponde al tratamiento 2)

implica que existe una menor proporción de células iniciadoras de tumores dentro del cultivo. Las líneas punteadas representan un intervalo de confianza del 95%.

Resumen esquemático de los ensayos de dilución límite (LDA)



Representación experimentos LDA



3. Detección de los niveles de MDK

Los niveles de MDK soluble se determinaron utilizando un kit de ELISA específico para MDK humana proporcionado por la empresa farmacéutica CellMid siguiendo las instrucciones del fabricante.

4. Western blot

El análisis de los niveles proteicos se llevó a cabo siguiendo el protocolo estándar. Las muestras se lisaron en un tampón que contiene Tris-HCl 50 mM, Triton X-100 0,1%, NaF 50 mM, glicerofosfato sódico 10 mM, pirofosfato sódico 5 mM, ortovanadato sódico 1mM, leupeptina 1µg/ml, EDTA y EGTA 1 mM, β-mercaptoetanol 200 µM, PMSF 100 µM y microcistina 1 µM. Por su parte, las muestras de tumores se lisaron en tampón RIPA suplementado con ortovanadato sódico 1 mM, PMSF 100 µM, 2 µg/µl de aprotinina y 2 µg/µl de leupeptina. Los lisados se centrifugaron a 12.000 rpm durante 15 minutos, cuantificándose la concentración de proteína mediante el método de Bradford. Tras diluir las muestras en

tampón de carga SBL 5X y calentarlas a 95°C durante 5 minutos, las proteínas se separaron electroforéticamente en geles con distintos porcentajes de acrilamida (Biorad, Hercules, CA, EE. UU.) en presencia de SDS y se transfirieron utilizando el sistema de transferencia Trans-Blot®-Turbo™ Transfer System en semiseco (BioRad) a membranas de PVDF (Biorad). El bloqueo de las membranas se llevó a cabo en una solución de leche desnatada al 5% o BSA al 5% (Sigma) en tampón TBS-T [Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, y Tween-20 al 0,1% (Panreac, #A4978)] durante 1 hora y se incubaron a 4°C durante toda la noche en agitación con el correspondiente anticuerpo primario (**Tabla M1**). Al día siguiente, tras lavar con TBS-T, las membranas se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (ECL anti-conejo ref. NA934 o ECL anti-ratón ref. NA931V, GE Healthcare, Chicago, EE.UU.) durante 1 hora a temperatura ambiente y finalmente se revelaron utilizando el sistema mejorado de quimioluminiscencia (ECL) (Biorad). La cuantificación densitométrica se realizó con el software ImageJ.

Anticuerpo primario	Especie	Dilución	Fabricante	Referencia
ALK	ratón	1/500	Santa Cruz Biotechnology	sc-398791
ATG5	conejo	1/1000	Cell Signaling	#12994
ATG7	conejo	1/1000	Santa Cruz Biotechnology	sc-33211
CASPASA-3 activa (D175)	conejo	1/500	Cell Signaling	#9661
CD133	conejo	1/500	Invitrogen	PA5-38014
HA (C29F4)	conejo	1/1000	Cell Signaling	#3724
LC3B (I/II) (MAP1LC3B)	conejo	1/3000	Sigma	L7543
MDK	ratón	1/250	Santa Cruz Biotechnology	sc-20715
MUSASHI-1 (MSI1)	ratón	1/750	Santa Cruz Biotechnology	sc-135721
NESTINA	conejo	1/500	Abcam	ab105389
PARP fragmentado (D214)	conejo	1/1000	Cell Signaling	#9541
p-ALK (Y1604)	conejo	1/250	Cell Signaling	#3341S
p-AKT (S473)	conejo	1/1000	Cell Signaling	#9271
p-ERK 1/2 (T202/Y204)	conejo	1/1000	Cell Signaling	#9102
p-STAT3 (Y705)	conejo	1/1000	Cell Signaling	#9145
SOX2	ratón	1/1000	R&D Systems	MAB2018
SOX4	conejo	1/500	Diagenode	CS129-100
SOX9	conejo	1/1000	Millipore	AB5535
α-TUBULINA	ratón	1/5000	Sigma	T9026
β-ACTINA	ratón	1/5000	Sigma	A5441

Tabla M1. Anticuerpos primarios utilizados en los experimentos de Western blot

5. PCR cuantitativa (qPCR)

La extracción del RNA de muestras de células o tejidos tumorales se realizó usando el reactivo Trizol (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante, que incluyen un tratamiento con DNasa (Qiagen, Hilden, Alemania). Para generar el correspondiente cDNA (retrotranscripción) se utilizaron entre 1,5 y 2 µg de RNA que se mezclaron con 2 µl de *random hexamers* en un tubo de reacción que se mantuvo durante 10 minutos a 65°C. Tras un pulso de centrifugación, se añadieron 4 µl de “*Transcriptor RT Reaction Buffer*” 5X, 0,5 µl de inhibidor de RNasa (Promega), 2 µl de una mezcla de dNTPs (dATP, dGTP, dCTP y dTTP) 10 mM y 0,5 µl de “*Transcriptor Reverse Transcriptase*”. Tras incubación a 25°C durante 10 minutos, las muestras se re-incubaron a 55°C durante 60 minutos. Finalmente, las muestras se calentaron a 85°C durante 5 minutos con el fin de inactivar la transcriptasa inversa.

Los ensayos de PCR cuantitativa (qPCR) se realizaron usando FastStart Master Mix con Rox (Roche, Basilea, Suiza) y las sondas se obtuvieron del “Universal Probe Library Set” (Roche). Las secuencias de los cebadores (directo y reverso) empleados para cada gen, se pueden encontrar en la **Tabla M2**. Las amplificaciones se realizaron en un sistema de PCR en tiempo real 7900 HT-Fast (Applied Biosystems, Carlsbad). Cada valor fue normalizado utilizando los niveles de expresión del RNA 18S, TBP (proteína de unión a TATA) o GAPDH (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa) como referencia. La expresión génica se cuantificó mediante la aplicación del método delta-delta Ct ($\Delta\Delta Ct$).

Gen	Cebador directo (5'-3')	Cebador inverso (5'-3')
<i>ALK</i>	CAAGTCCTTCCTCCGAGAGAC	AGCCACGTGCAGAAGGTC
<i>ATG5</i>	CAACTTGTTTCACGCTATATCAGG	CACTTTGTCAGTTACCAACGTCA
<i>BMI1</i>	CCATTGAATTCTTTGACCAGAA	AGCCACGTGCAGAAGGTC
<i>HES1</i>	GAAGCACCTCCGGAACCT	GTCACCTCGTTTCATGCACTC
<i>ID1</i>	GGTCCCTGATGTAGTCGATGA	CCAGAACCGCAAGGTGAG
<i>MDK</i>	ACCAAAGCAAAGGCCAAAG	ACTGGTGGGTCACATCTCG
<i>MSI1</i>	CCAATGGGTACCACTGAAGC	CACTCGTGGTCCTCAGTCAG
<i>NESTIN</i>	TGCGGGCTACTGAAAAGTTC	TGTAGGCCCTGTTTCTCCTG
<i>NOTCH3</i>	GCCAAGCGGCTAAAGGTA	CACTGACGGCAATCCACA
<i>SOX2</i>	GGGGGAATGGACCTGTATAG	GCAAAGCTCCTACCGTACCA
<i>SOX4</i>	AGCCGGAGGAGGAGATGT	TTCTCGGGTCATTTCCTAGC
<i>SOX9</i> (humano)	GTACCCGCACTTGCAACAAC	TCTCGCTCTCGTTCAGAAG
<i>Sox9</i> (ratón)	GTACCCGCATCTGCACAAC	CTCCTCCACGAAGGGTCTCT
<i>SURVIVINA</i>	GCCCAGTGTTTCTTCTGCTT	AACCGGACGAATGCTTTTAA

Tabla M2. Cebadores utilizados en los experimentos de qPCR.

6. Inmunofluorescencia y microscopía

Las neuroesferas se fijaron en suspensión con paraformaldehído al 4% (Sigma-Aldrich, #P6148) durante 10 minutos y se centrifugaron durante 5 minutos a 1.200 rpm. El pellet se resuspendió en agua autoclavada y las células se sembraron en cubreobjetos de vidrio de 12 mm pre-tratados con poli-lisina (1 mg/ml). Posteriormente, estas células se permeabilizaron con Triton X-100 (Sigma, #T9284) al 0,25% (PBS-T) y se bloquearon con suero de cabra al 10% en PBS-T durante 1 hora para posteriormente ser incubadas con los correspondientes anticuerpos primarios que se indican en la **Tabla M3** durante toda la noche a 4°C. A la mañana siguiente, los cubreobjetos se lavaron con PBS-T y se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con Alexa-488 o Alexa-594 (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE. UU.) a una dilución 1/1.000 a temperatura ambiente durante 1 hora en oscuridad. Los núcleos se tiñeron con DAPI (Roche) a una dilución 1/10.000 durante 10 minutos. Finalmente, los cubreobjetos se montaron con Mowiol (Milipore, #475704) y las imágenes se obtuvieron en un microscopio confocal Leica TCS SP2 (Leica, Alemania).

Anticuerpos primarios	Especie	Dilución	Fabricante	Referencia
NESTINA	conejo	1/500	Abcam	ab105389
LC3B (I/II) (MAP1LC3B)	conejo	1/350	Sigma	L7543
LC3B (I/II) (MAP1LC3B)	ratón	1/100	Sigma	M152-3

Tabla M3. Anticuerpos primarios utilizados en los experimentos de inmunofluorescencia *in vitro*.

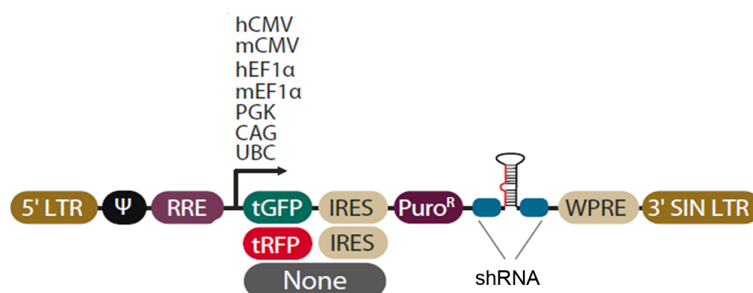
En el caso de la microscopía de campo claro, las imágenes mostradas se tomaron con un microscopio Eclipse TE300 de Nikon (Minato, Tokio, Japón) acoplado a una cámara digital DS-U2 (Nikon).

7. Transducción con partículas lentivirales

7.1 Generación de las partículas lentivirales

Para la generación de partículas lentivirales inducibles con doxiciclina (*shC* y *shATG5*), 3×10^6 células HEK293T se sembraron en placas de 100 mm y se transfectaron 8 horas después, utilizando el método del fosfato cálcico (CaCl_2), con un plásmido TRIPZ que expresa un *shRNAcontrol* (*shC*) o un *shRNA* frente al gen *ATG5* humano (ref. V2THS_249282, Thermo Scientific) inducibles con doxiciclina (**Figura M3**). Para ello, 15 µg del plásmido se incubaron con 5 µg de 3 plásmidos empaquetadores (pTAT, psPAX y VSV-G), CaCl_2 25 mM y tampón HBS (del inglés *Hepes Buffered Saline*, compuesto por HEPES 50 mM, NaCl 280 mM, KCl 10 mM, Na_2HPO_4 1,5 mM y glucosa 12 mM) a pH 7,05 durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, esta mezcla se adicionó gota a gota sobre la placa sembrada con células HEK293T, y tras 16 horas de incubación, el medio con fosfato cálcico se reemplazó por medio DMEM completo con un porcentaje reducido de suero (5% FBS). 48 horas más tarde, el sobrenadante procedente de estas células se filtró mediante la utilización de filtros específicos

Millex-HV de 0,45 μm (Millipore) para eliminar los restos celulares. Posteriormente, las partículas lentivirales se concentraron mediante la incubación de este sobrenadante con el concentrador Lenti-X™ (Clontech ref PT4421-2, Fremon, CA, EEUU) en una relación 1:3 a 4°C y en agitación durante toda la noche.



Elementos del vector	Funcionalidad
5' LTR	Producción de la partícula lentiviral e integración en el genoma del hospedador
Ψ	Secuencias que permiten el empaquetado del genoma viral
RRE	Elementos de respuesta Rev que potencian la producción viral favoreciendo la eficacia de empaquetado
GFP/RFP	Reporteros que permiten confirmar la correcta transducción y expresión del correspondiente shRNA
IRES (<i>Internal Ribosome Entry Site</i>)	Permite la expresión de GFP/RFP y el gen de resistencia a antibiótico en un único transcrito
Puro ^R	Gen de resistencia a puromicina que permite la selección de aquellas células transducidas eficientemente con el shRNA
shRNA	Secuencia génica que permite reducir la expresión del gen diana de interés
WPRE (<i>Woodchuck Post-transcriptional Regulatory Element</i>)	Potencia la expresión del shRNA en la célula transducida
3' SIN LTR	Incrementa la seguridad del lentivirus

Figura M3. Componentes del plásmido TRIPZ utilizado para la generación de partículas lentivirales que expresan un *shATG5* inducible por doxiciclina frente al gen *ATG5* humano.

Finalmente, las partículas lentivirales se precipitaron mediante centrifugación a 1.500 G durante 45 minutos a 4°C, se retiró el sobrenadante y el pellet se resuspendió en medio DMEM sin suero para almacenarse a -80°C hasta su utilización. El título de las partículas lentivirales se determinó mediante la transfección de células HEK293T sembradas en placas de 24 pocillos con diluciones seriadas generadas a partir de las partículas lentivirales originales y el conteo posterior del número de células GFP o RFP positivas en cada pocillo.

7.2 Transducción de cultivos de GICs con partículas lentivirales

La inhibición de la expresión génica de *ATG5*, *ATG7*, *MDK* y *ALK* se llevó a cabo mediante la transducción de los diferentes cultivos de GICs con partículas lentivirales que expresan un shRNA específico frente al correspondiente gen. El silenciamiento de *ATG5* se llevó a cabo tanto de forma inducible (utilizando las partículas lentivirales *shATG5* inducibles por doxiciclina generadas siguiendo el protocolo citado con anterioridad) como constitutiva (utilizando las partículas lentivirales con referencia sc-41445-V, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, EE. UU.). Para silenciar la expresión de *MDK* y *ALK* de forma inducible utilizamos

partículas lentivirales que poseen 3 *shRNAs* distintos inducibles por doxiciclina procedentes de ThermoScientific para el caso de la MDK (#VSH6376) o de GE Healthcare Dharmacon para el caso de ALK (#V3SH7669). Como control se utilizaron partículas lentivirales que expresan un *shRNA* constitutivo (Santa Cruz Biotechnology) o inducible con doxiciclina (GE Healthcare Dharmacon) dirigido frente a secuencias inespecíficas (*shC*).

En todos los casos, para llevar a cabo la transducción de las GICs, las esferas disgregadas se sembraron a una densidad de 10^4 células/ml en un medio completo de GICs que contiene bromuro de hexadimetrina o Polybrene (Sigma, ref. H9268-5G) a una concentración final de 2,5 mg/ml y las correspondientes partículas lentivirales en una relación de 0,75 unidades de transducción/ml. Transcurridas 48 horas, este medio se reemplazó por un medio completo de GICs sin bromuro de hexadimetrina. Finalmente, para seleccionar aquellas células transfectadas que expresan de forma estable los correspondientes *shRNAs*, éstas se incubaron con puromicina a una concentración creciente de entre 1 y 5 $\mu\text{g/ml}$. Para inducir la expresión del *shRNA*, se añadió doxiciclina (Dox) a una concentración final de 1 $\mu\text{g/ml}$. Todos los experimentos realizados con células infectadas con *shRNAs* inducibles se realizaron al menos dos pases después de la adición de doxiciclina para asegurar la expresión apropiada del correspondiente *shRNA*.

8. Modelos animales

8.1 Modelo transgénico *Nestina-Tva*

Los plásmidos RCASY-Control y RCASY-PDGFB-HA fueron amablemente cedidos por el laboratorio de Dolores Hambarzumyan (Universidad de Emory, Atlanta, EE.UU.). La construcción MDK-V5 se obtuvo de un plásmido pcDNA-A mediante digestión con las enzimas de restricción PmeI y NotI (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) y se subclonó en el plásmido RCASY mediante la utilización de la enzima de restricción PmeI. Los mapas de restricción de los correspondientes plásmidos de origen se muestran en la **Figura M4**.

Las células DF-1 (fibroblastos embrionarios de pollo con capacidad para generar virus que infectan aquellas células que expresan el receptor TVA) se sembraron el día previo a la transfección a una densidad de entre 250.000-300.000 células/pocillo en una placa p6. Un par de horas antes de la transfección, estas células se transfirieron a un medio DMEM con suero pero sin antibióticos. Posteriormente, en cada pocillo se adicionó una mezcla de transfección que contenía 3 μg del DNA correspondiente a cada plásmido y polietilenimina (PEI, ref. 24765, Warrington, PA, EE.UU.) como reactivo de transfección en una relación 1:4 p/v con el DNA de interés disueltos en medio Opti-MEM (Gibco). Transcurridas 48 horas, las células se tripsinizaron, se sembraron en medio completo y se realizaron 2 o 3 pases adicionales para favorecer la liberación de virus y la subsecuente infección de un mayor número de células DF-1, antes de valorar los niveles de MDK y HA. Una vez confirmada la sobre-expresión de nuestras proteínas de interés, las células transfectadas se centrifugaron a 900 rpm durante 5 minutos. 50.000 células DF-1 resuspendidas en 1 μl de medio DMEM completo se inyectaron

MATERIALES Y MÉTODOS

en la región frontal derecha (zona anterior a la sutura coronal) de ratones transgénicos *Nestina-Tva* [Tg (NES-TVA) J12Ech/J ref. 003529, Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, EEUU)] con entre 2 y 4 días de edad, momento en el que poseen un mayor número de células NESTINA positivas susceptibles a la infección viral. Para ello inmovilizamos al ratón de forma manual e inyectamos las células a un flujo constante mediante el uso de una jeringa Hamilton de 10 μ l con una aguja de 0,47 mm (26s) de diámetro externo (Hamilton #84877, Reno, Nevada, EEUU). En el caso de la sobre-expresión combinada de PDGFB y MDK, un total de 50.000 células de cada condición (100.000 células en total) se resuspendieron en 1 μ l de medio DMEM completo y se inyectaron siguiendo el mismo protocolo descrito anteriormente. Un esquema con las etapas más relevantes de este proceso se recoge en la **Figura M5**.

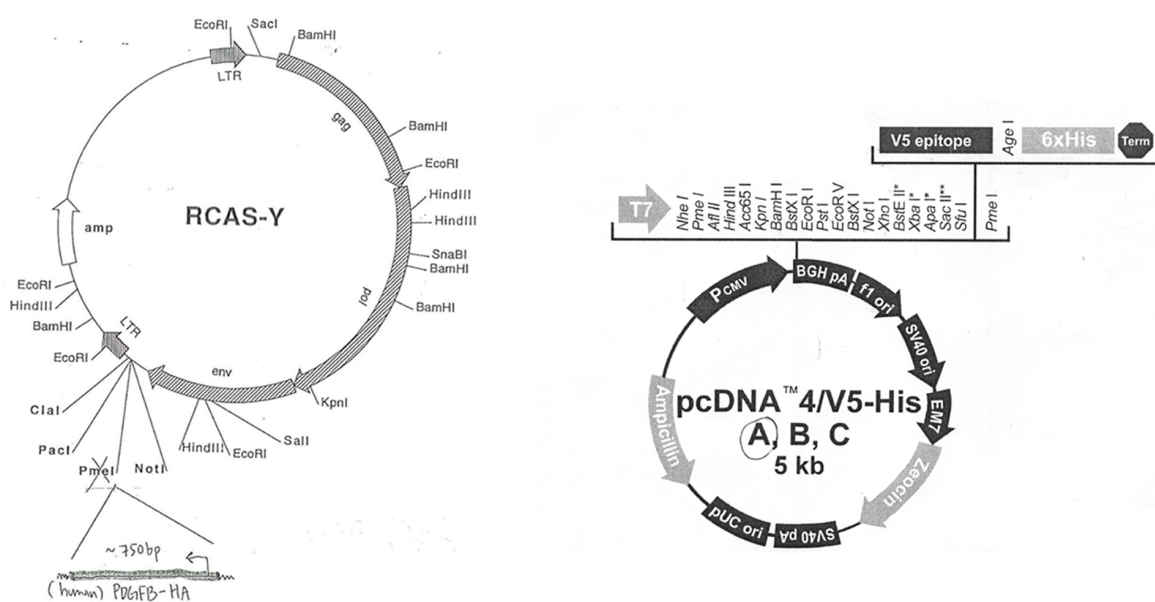


Figura M4. Mapas de restricción de los plásmidos utilizados en el modelo transgénico *Nestina-Tva*. **Panel izquierdo:** Vector RCASY en el que se ha introducido la secuencia correspondiente a PDGFB-HA mediante la digestión del plásmido con la enzima de restricción PmeI (el sitio de corte para PmeI se pierde en el proceso). **Panel derecho:** Plásmido pcDNA4A utilizado para obtener la secuencia MDK-V5 que es subclonada en el plásmido RCASY, en la misma posición que el PDGFB-HA.

Tras 14 semanas (o antes si se observaron síntomas como letargia o pérdida descontrolada de peso), los animales fueron sacrificados y sus cerebros extraídos y guardados en paraformaldehído al 4% para su posterior análisis histopatológico mediante tinción con hematoxilina-eosina siguiendo los métodos estándar y tinción inmunohistoquímica con los anticuerpos HA y MDK utilizados para Western blot. El patólogo encargado del citado análisis fue la Dr. Juana María Flores de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense (Madrid, España).

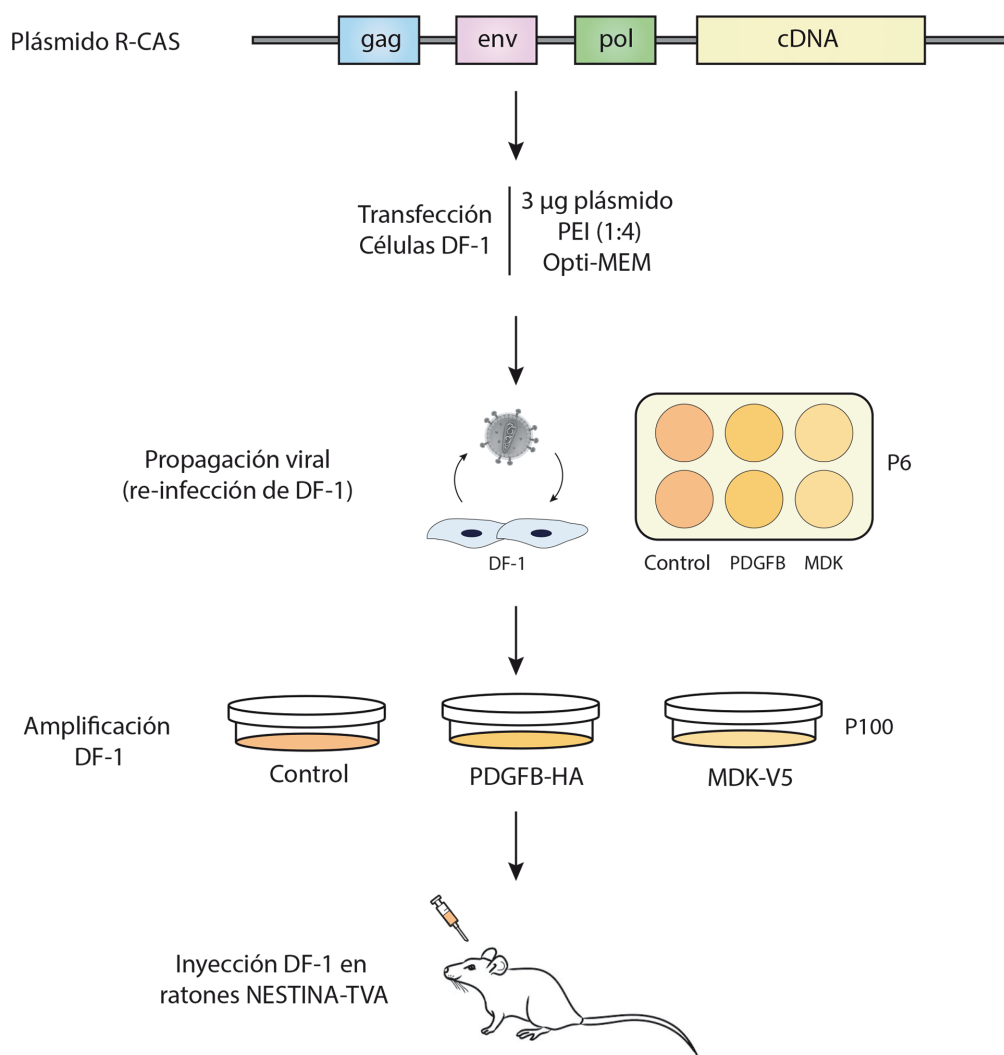


Figura M5. Protocolo experimental en el modelo transgénico *Nestina-Tva*. Resumen esquemático de las etapas (*in vitro* e *in vivo*) necesarias para la sobre-expresión de MDK y PDGFB en el modelo transgénico *Nestina-Tva*.

La detección del transgén *TVA* se realizó mediante el genotipado de los ratones procedentes de la colonia NES-TVA. Para ello extrajimos el DNA de muestras procedentes de estos ratones mediante digestión del correspondiente material celular en un tampón de digestión (Tris-HCl 20 mM pH 8, EDTA 2,5 mM, NaCl 200 mM y SDS 0,1%) suplementado con proteinasa K (Roche #03115879001) al 0,03% a 55°C durante 4 horas. Posteriormente, las muestras se incubaron con NaCl 5 M y el correspondiente sobrenadante se mezcló con isopropanol primero y etanol al 70% después para aislar la fracción correspondiente al DNA, que finalmente se resuspendió en agua miliQ. Este DNA fue sometido a una PCR en la que se utilizaron los cebadores que se muestran en la **Tabla M4** (Thermo Scientific), siguiendo las condiciones que se detallan en la **Tabla M5**. Los productos de la PCR se separaron en geles de agarosa al 1,5%, observándose una banda de aproximadamente 400 pares de bases correspondiente al control interno y una banda de aproximadamente 500 pares de bases en el caso de que estos animales tuvieran el transgén.

Cebadores	Secuencia 5'-3'
oIMR 1111	CTGCTGCCCCGTAACGTGACCGG
oIMR 1112	GCCCTGGGGAAGGTCTGCCC
oIMR 3172	AGAGCTCCGGGTTCTCTCTC
oIMR 3173	GGGAGGAAGGAAGTCCACTC

Tabla M4. Cebadores utilizados para el genotipado de los ratones transgénicos *Nestina-Tva*.

Etapas	Temperatura	Tiempo	Notas
Etapas 1	94 °C	3 min.	
Etapas 2	94 °C	30 seg.	
Etapas 3	66 °C	1 min.	
Etapas 4	72 °C	1 min.	Repetir etapas (2-4) durante 35 ciclos
Etapas 5	72°C	10 min.	

Tabla M5. Condiciones de la PCR llevada a cabo para determinar el genotipo de los ratones *Nestina-Tva*.

8.2 Generación de tumores subcutáneos e intracraneales

Para generar tumores heterotópicos o subcutáneos, 5×10^6 células U87 resuspendidas en 100 μ l de PBS suplementado con 0,1% glucosa o 2×10^6 células 12012 resuspendidas en 100 μ l de una mezcla 1:1 compuesta por medio completo de GICs y matrigel (BD Bioscience ref. 354230, NY, EE. UU.), se inyectaron en el flanco derecho de ratones inmunodeficientes de 5 semanas de edad (Harlan Laboratories, Indiana, EE.UU.). Los tumores se midieron diariamente con un calibre externo, y el volumen se calculó utilizando la fórmula: $(4\pi / 3) \times (\text{ancho} / 2)^2 \times (\text{longitud} / 2)$. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño promedio de 200 mm³, los animales se asignaron aleatoriamente a diferentes grupos experimentales y comenzamos los tratamientos con los fármacos correspondientes. Al final del tratamiento, los animales se sacrificaron y se extrajeron los correspondientes tumores, que se dividieron en diferentes secciones y se congelaron a -80°C (para su posterior análisis mediante Western blot o qPCR) o se embebieron en Tissue-Tek (Sakura ref. 4583, Finetec, CA, EE.UU.) y se congelaron a -80°C para su posterior análisis mediante inmunofluorescencia.

Para la generación de tumores intracraneales u ortotópicos, podemos distinguir 2 tipos de experimentos:

8.2.1 Evaluación del efecto de distintos fármacos sobre el crecimiento de tumores intracraneales

3×10^5 células U87 resuspendidas en 4 μ l de PBS o $7,5 \times 10^4$ 12012-GICs resuspendidas en 4 μ l de medio completo de GICs se inyectaron en el estriado del hemisferio cerebral derecho

de ratones inmunodeficientes de 5 semanas de edad (coordenadas A-P: +1 mm; M-L: -2 mm; D-V: -3 mm respecto al Bregma) con la ayuda de un aparato de estereotaxia y una jeringa Hamilton de 10 µl modelo 701RN con una aguja 26s ga 2" (Hamilton, #7635-01). Para ello, los animales se anestesiaron con isoflurano (Isoflo #5683, Esteve, Madrid, España) y se les inyectó subcutáneamente una mezcla de buprenorfina (0,1 mg/kg) y meloxicam (1 mg/kg) para inducir la analgesia en las horas posteriores a la intervención quirúrgica. Posteriormente, estos animales se asignaron a diferentes grupos experimentales de forma aleatoria y comenzaron a ser tratados con los distintos fármacos siguiendo las pautas indicadas en cada experimento.

Tanto en el caso de los tumores subcutáneos como intracraneales, los cannabinoides se diluyeron en aceite de sésamo, el crizotinib se diluyó en PBS y el lorlatinib en agua con un rango de pH de entre 2,75 y 3,25 y todos ellos se administraron por vía oral utilizando una sonda intragástrica. La TMZ se diluyó en PBS suplementado con 5 mg/ml de BSA y se administró por vía intraperitoneal (I.P.). El diluyente correspondiente se utilizó como vehículo o control para cada tratamiento.

8.2.2 Evaluación del efecto producido por el silenciamiento de MDK y ALK en tumores intracraneales generados con GICs

Células 12012 con menos de 3 pases se transdujeron con partículas lentivirales que expresan un *shRNA* control (*shC*), *shMDK* o *shALK* inducibles por doxíciclina y posteriormente se seleccionaron utilizando puromicina (1-5 µg/ml). Una semana antes de la inyección intracraneal, que se realizó siguiendo el mismo protocolo descrito anteriormente, se indujo la expresión del correspondiente *shRNA* mediante el tratamiento de estas células con doxíciclina a una dosis de 1 µg/ml. Con la finalidad de asegurar la expresión del *shRNA in vivo*, los animales fueron alimentados con una dieta especial enriquecida en doxíciclina (Sodispan ref. 1816785-209, Madrid, España). Los ratones inyectados con células no tratadas con doxíciclina se alimentaron con una dieta equivalente en composición y contenido calórico, pero sin doxíciclina.

En todos los experimentos intracraneales, la monitorización del crecimiento tumoral se realizó mediante imagen de resonancia magnética nuclear (iRMN) en el Centro de Resonancia Magnética Nuclear de la Universidad Complutense (Madrid, España) utilizando un equipo BIOSPEC BMT 47/40 (Bruker, Ettlingen, Alemania). El volumen del tumor se calculó utilizando el software Image J a partir de imágenes ponderadas o potenciadas en T1 obtenidas tras la administración de gadolinio como agente de contraste. Finalmente, evaluamos la supervivencia de los ratones incluidos en los correspondientes estudios, sacrificándose cuando mostraron síntomas como letargia, pérdida de peso o alteraciones motoras.

Todos los procedimientos relacionados con el manejo de animales se realizaron con la aprobación de los comités de ética correspondientes de la Universidad Complutense y la Comunidad de Madrid de acuerdo a la legislación europea vigente.

9. Nucleofección con plásmidos

Para sobre-expresar o silenciar *SOX9*, los cultivos de GICs se nucleofectaron con un plásmido que expresaba un *shRNA* selectivo frente a *SOX9* [(pLKO*shSOX9* (Addgene #40644, Cambridge, MA, EE.UU.)) o un plásmido que sobreexpresaba una forma murina de *SOX9* [(pWXL*SOX9*, Addgene #36979)] respectivamente. Como controles, se utilizaron un plásmido pLKO que expresaba un *shRNA* inespecífico (Addgene #8453) o un plásmido pWPXLGFP (Addgene, #12257).

De forma resumida, 5×10^5 GICs por condición se centrifugaron a 1.100 rpm durante 5 minutos, se resuspendieron en 50 μ l de una solución de nucleofección (Lonza, #VPG-1001) y se electroporaron con 3 μ g del plásmido correspondiente empleando el dispositivo NucleofectorTM 2b (Lonza, #AAB-1001). Todos los experimentos con células nucleofectadas se llevaron a cabo al menos 4 días después de la electroporación con la finalidad de asegurar la correcta expresión del *shRNA* o la sobre-expresión de *SOX9*.

10. Inmunofluorescencia de tumores y TUNEL

Las muestras embebidas en Tissue-Tek y congeladas a -80°C se cortaron en secciones de 8 μ m de grosor usando un criostato Leica CM 1950 (Wetzlar, Alemania). Las secciones se fijaron en acetona durante 10 minutos y posteriormente se permeabilizaron, bloquearon e incubaron con los correspondientes anticuerpos primarios (**Tabla M6**) y secundarios siguiendo el mismo protocolo citado anteriormente para la inmunofluorescencia de células.

Anticuerpos primarios	Especie	Dilución	Fabricante	Referencia
Ki67	conejo	1/500	Thermo Scientific	R1-9106
CD31	ratón	1/500	Thermo Scientific	13-0311-82

Tabla M6. Anticuerpos primarios utilizados en los experimentos de inmunofluorescencia *in vivo*.

La técnica de TUNEL se realizó utilizando el kit *In situ Cell Death Detection Kit* de Roche (Sigma Aldrich, ref. 11684795910) siguiendo las instrucciones del fabricante. Esta técnica permite evaluar la apoptosis basándose en la incorporación de deoxiuridina biotinilada a los extremos 3'OH del DNA tras su fragmentación durante las últimas etapas de la apoptosis mediante la acción de la enzima deoxinucleotidil transferasa terminal (TdT). Posteriormente, la unión de la estreptavidina marcada al sustrato biotinilado permite la emisión de una señal fluorescente que puede ser cuantificada. Los núcleos se tiñeron con DAPI y posteriormente las secciones se montaron con Mowiol. Las imágenes se obtuvieron en un microscopio Axiovert 135 (Carl Zeiss, Thornwood, NY, EE. UU).

11. Ensayos de viabilidad celular

La viabilidad celular se determinó mediante la utilización del reactivo WST-1 (Sigma-Aldrich, ref. 11644807001). El WST-1 es una sal de tetrazolio que puede ser escindida por las deshidrogenasas mitocondriales que participan en la respiración celular, produciendo un compuesto coloreado (formazán) que puede cuantificarse mediante el análisis de la absorbancia a una longitud de onda comprendida entre 420 y 480 nm. Un incremento en el número de células viables implica por tanto un aumento en la actividad de las deshidrogenasas mitocondriales. De esta manera, la intensidad del color producido puede correlacionarse con el número de células viables presentes en el cultivo. Este método de evaluación de la viabilidad celular es más rápido y sensible que otros métodos habitualmente utilizados como el MTT, y está especialmente indicado para valorar la viabilidad de células que crecen en suspensión.

De forma resumida, las GICs se sembraron en pocillos de placas p96 a una densidad de 5.000 células/pocillo y tras los correspondientes días de incubación con los distintos tratamientos se adicionó el reactivo WST-1. Tras 4 horas de incubación, se midió la absorbancia de la placa p96 a 450 nm.

12. Inmunoprecipitación

El protocolo de inmunoprecipitación requiere 2 etapas:

a) Unión covalente de anticuerpo y proteína G sefarosa:

En primer lugar, se llevó a cabo la incubación covalente del anticuerpo LC3 (Sigma, #L8918) o de una IgG inespecífica (control negativo) con la proteína G sefarosa (GE Healthcare, Chicago, EE. UU). Para ello, una alícuota de proteína G sefarosa se lavó en PBS y se incubó con el anticuerpo en una proporción 1 µg anticuerpo: 1 µl proteína G sefarosa en agitación durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, los conjugados se lavaron primero con PBS y posteriormente 3 veces con borato de sodio 0,1 M pH 9.3 antes de ser incubados en agitación durante 30 minutos y a temperatura ambiente, 2 veces consecutivas, con una solución de borato de sodio pH 9.3 a la que se le añadió dimetil pimelimidato (DMP, Sigma, ref. D8388) a una concentración final de 20 mM. A continuación, los conjugados se lavaron 4 veces con glicina 50 mM pH 2,5 y 2 veces con Tris-HCl 0,2 M a pH 8,0, incubándose posteriormente con este tampón durante 2 horas en agitación a temperatura ambiente. Finalmente, los conjugados se centrifugaron y el pellet se resuspendió en PBS y se almacenó a 4°C hasta su utilización.

b) Inmunoprecipitación de proteínas:

24 horas después de ser incubadas con los distintos tratamientos, las células se lisaron utilizando un tampón de lisis que contenía HEPES 40 mM pH 7,5, NaCl 120 mM, EDTA 1 mM, pirofosfato sódico 10 mM, glicerofosfato sódico 10 mM, fluoruro sódico 50 mM, ortovanadato

sódico 0,5 mM y CHAPS al 0,3% suplementados con benzamidina 1 mM y PMSF 0,1 mM. Los lisados celulares (1-2 mg) se incubaron con 10 µl de proteína G-sefarosa en agitación durante 30 min a 4°C para evitar la generación de uniones inespecíficas, se centrifugaron a 6.000 rpm durante 2 minutos y se incubaron con 5 µl de proteína G-sefarosa acoplada covalentemente a 5 µg del correspondiente anticuerpo primario en agitación durante toda la noche a 4°C. Los inmunoprecipitados se lavaron después 4 veces con tampón de lisis seguidas de 2 veces más con tampón quinasas (HEPES 25 mM pH 7,5 y KCl 50 mM). Posteriormente se resuspendieron en 30 µl de tampón de carga SBL 1x sin 2-mercaptoetanol y se centrifugaron a máxima velocidad en tubos *Eppendorf* acoplados a filtros con un tamaño de poro de 0,22 µm (Sigma, ref. CLS8160). Finalmente, se añadió 2-mercaptoetanol al 1% (v/v) en tampón de carga SBL 5x y las muestras se calentaron a 95°C durante 5 minutos antes de someterse a electroforesis e inmunotransferencia siguiendo los procedimientos estándar citados en la sección de Western blot.

13. Análisis molecular de los cultivos de GICs

El análisis de las mutaciones y alteraciones genéticas presentes en los cultivos de células GH2, 12012 y HCO1, se realizó en colaboración con el servicio de Anatomía Patológica del Hospital 12 de Octubre. En primer lugar, se llevó a cabo la extracción del DNA presente en estas células. Para ello, el correspondiente *pellet* de células se resuspendió en 200 µl de buffer de lisis T1 (Genómica, ref. BK0295-050) en presencia de proteinasa K a una dilución 1/10 y se incubó en agitación durante 2 horas a 56°C. Posteriormente, se adicionaron 200 µl de Solución B3 (Genómica) y 200 µl de etanol 96% antes de pasar la muestra por una columna de extracción de DNA. El eluido se resuspendió en una solución de lavado AW1 (Genómica) seguida de una centrifugación a 12.000 rpm durante 2 minutos, y el *pellet* obtenido se resuspendió en 20 µl de agua destilada y se congeló a -20°C hasta su utilización.

Posteriormente se creó un panel de hasta 30 genes que habitualmente se encuentran alterados en glioma usando el *software* específico *Ion AmpliSeq Designer* (Thermo Fisher Scientific), un método de secuenciación de alto rendimiento o “*next generation*”. La detección de variaciones en el número de copias (CNVs) se realizó mediante el uso del *software* *Ion reporter* (Thermo Fisher Scientific).

14. Análisis de bases de datos de pacientes y análisis bioinformático

Las gráficas de supervivencia de Kaplan-Meier se obtuvieron del portal “Gliovis” (Bowman et al., 2017), una aplicación diseñada por el Dr. Massimo Squatrito para la visualización de datos y análisis de la expresión de distintos genes en una amplia colección de muestras de pacientes con tumores cerebrales. En nuestro caso, estudiamos la posible correlación existente entre niveles de expresión de MDK y supervivencia de los pacientes incluidos en diferentes estudios: Rembrandt (Madhavan et al., 2009), Gravendeel (Gravendeel et al., 2009), Lee (Lee et al., 2008) y el atlas del genoma humano (McLendon et al., 2008). La mediana de los niveles de expresión de MDK se utilizó como punto de corte para determinar

si los niveles de MDK fueron considerados altos o bajos. El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo utilizando el programa o *software* R.

15. Citometría de flujo

Entre 500.000 y 1.000.000 de GICs por condición se lavaron con PBS y se centrifugaron a 1.400 rpm durante 5 minutos. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo antiCD133 PE (RyDSystem #FAB11331P, Mineapolis, Minnesota, EE.UU) en oscuridad durante 20 minutos a 4°C y se lavaron en 1 ml de tampón de Anexina-V 1x. Tras centrifugar 5 minutos a 1.400 rpm, las muestras se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente durante 15 minutos con la Anexina V y el DAPI y se analizaron en el equipo LSRFortessa (BD/Becton, Dickonson and Company, NY, EE.UU.). Los análisis se realizaron con el programa Flowjo v7.6.5 (Tree star, Ashland, EE.UU).

16. Estadística

Los datos presentados en esta tesis están expresados como media \pm error estándar de la media (SEM). Cuando se analizaron 2 grupos independientes, se utilizó un test t-Student no pareado. Para comparaciones múltiples, se utilizó un análisis de la varianza (ANOVA) de 1 o 2 vías según correspondiese con un análisis *post hoc* mediante el test de Tukey. Los experimentos de LDA se analizaron mediante el test chi-cuadrado (χ^2). La supervivencia, tanto de los pacientes incluidos en las bases de datos públicas en las que se analizaron los niveles de MDK, como de los ratones inmunodeficientes en los experimentos *in vivo* (curvas Kaplan-Meier), fue analizada mediante el método log-rank test. En todos los casos, un valor P menor de 0,05 fue considerado estadísticamente significativo. Todos los análisis se realizaron mediante el uso del programa GraphPad Prism 6.0.

RESULTADOS

- Objetivo 1: Optimización de la terapia antitumoral frente al GBM basada en el uso de cannabinoides

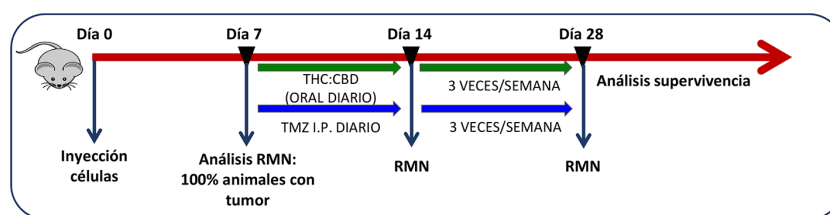
1.1 La administración de THC y CBD en combinación con TMZ reduce el crecimiento de tumores intracraneales generados con células U87

Como se ha descrito en la Introducción de esta tesis, la terapia estándar para el tratamiento del GBM se basa en la resección quirúrgica del tumor seguida de una administración combinada de radioterapia y quimioterapia con el agente alquilante TMZ (Stupp et al., 2005). Sin embargo, estos tratamientos tan solo consiguen aumentar de forma discreta la supervivencia media de estos pacientes (Yang et al., 2014), por lo que es extraordinariamente relevante desarrollar nuevas estrategias terapéuticas dirigidas a mejorar su supervivencia y su calidad de vida.

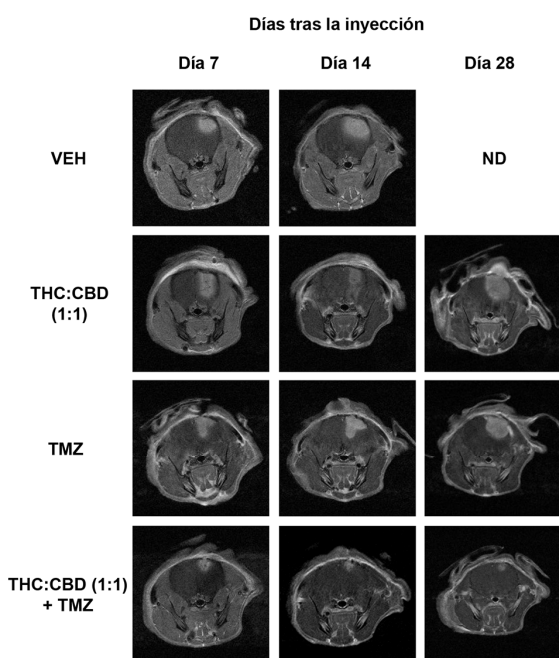
Trabajos previos de nuestro grupo de investigación han demostrado que el tratamiento con THC o con extractos cannabinoides enriquecidos en THC (THC-BDS) reduce significativamente el crecimiento de tumores subcutáneos generados con líneas celulares de glioma en ratones inmunodeficientes (Velasco et al., 2012). Además, la combinación de THC y CBD o de extractos enriquecidos en ambos compuestos (una mezcla con una composición muy similar a la del fármaco Sativex) produce también una disminución del crecimiento tumoral (Torres et al., 2011). Los resultados obtenidos en esos estudios muestran igualmente que la combinación de THC (o de THC y CBD en una proporción 1:1) y TMZ ejerce un efecto anti-tumoral mucho más potente en xenoinjertos derivados de células de glioma que el que produce el THC, la combinación de THC y CBD o la TMZ cuando se administran de manera individual (Torres et al., 2011). Resultados similares se obtuvieron cuando se utilizaron las correspondientes combinaciones de extractos BDS enriquecidas en THC y CBD junto con TMZ utilizando distintas vías de administración (López-Valero et al., 2018a).

Con la finalidad de evaluar el efecto antitumoral de las terapias basadas en la combinación de cannabinoides y TMZ en un modelo capaz de reproducir de forma más precisa el microambiente en el que se origina y desarrolla un glioma, generamos tumores ortotópicos mediante la inyección intracraneal de células U87MG en el estriado de ratones inmunodeficientes. Tras comprobar mediante imagen de resonancia magnética (iRMN) que todos los animales inyectados habían desarrollado tumores una semana después de la inoculación de las células, comenzamos el tratamiento con cannabinoides [(THC-BDS (7,5 mg/kg) + CBD-BDS (7,5 mg/kg))] y TMZ (5 mg/kg) siguiendo las pautas descritas en el esquema de la **Figura R1A**. La administración individual de TMZ o cannabinoides redujo de forma significativa el tamaño de los tumores y el tratamiento combinado inhibió el crecimiento tumoral de manera más potente que los tratamientos individuales (**Figura R1B-C**). Del mismo modo, aunque el tratamiento con THC:CBD o TMZ prolongó ligeramente la

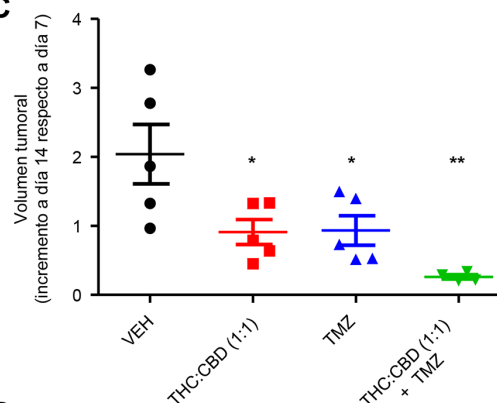
A



B



C



D

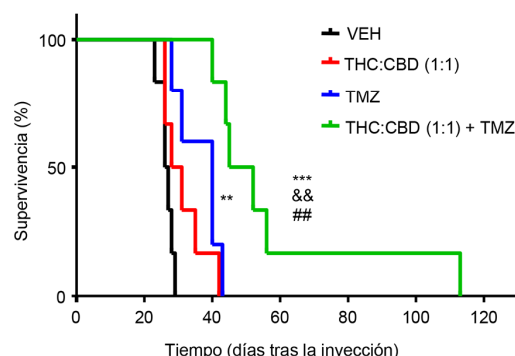


Figura R1. El tratamiento con THC:CBD (1:1) y TMZ reduce significativamente el crecimiento de tumores intracraniales generados con células U87MG

(A) Esquema del diseño experimental. **(B-C)** Efecto de la administración oral de THC:CBD (1:1) [THC-BDS (7,5 mg/kg) + CBD-BDS (7,5 mg/kg)] y TMZ (5 mg/kg, administración I.P.) en el tamaño de tumores generados mediante la inyección intracranial de 3×10^5 células U87MG (n=5). **(B)** Imágenes representativas de RMN del tamaño tumoral a diferentes tiempos post-inyección para cada condición experimental. A día 28, ninguno de los ratones VEH seguía vivo (ND=no determinado). **(C)** Representación gráfica de los volúmenes tumorales. Los datos se representan como el cambio en el volumen del tumor a día 14 en relación con el día 7 para cada animal de cada grupo experimental. Las barras incluidas en la gráfica corresponden al cambio medio en el volumen del tumor en relación con el día 7 \pm SEM; (n = 5) * P <0,05; ** P <0,01 respecto a los tumores tratados con VEH. **(D)** Efecto de los diferentes tratamientos sobre la supervivencia de los ratones que portan estos tumores. Los datos se representan en una gráfica de Kaplan-Meier. (n=5-6). ** P <0,01; *** P <0,001 respecto a ratones tratados con VEH. && P <0,01 respecto a tumores tratados con THC:CBD (1:1); ## P <0,01 respecto a tumores tratados con TMZ.

supervivencia de los ratones que portaban estos tumores, se observó un efecto significativamente mayor en aquellos ratones a los que se administró la combinación de THC-BDS+CBD-BDS y TMZ (**Figura R1D**).

Estos resultados refuerzan la idea de que la administración conjunta de TMZ con THC y CBD (1:1) produce una potente acción antitumoral no solo en tumores subcutáneos, sino también en modelos ortotópicos generados con líneas celulares de glioma.

1.2 El tratamiento con preparaciones cannabinoides que poseen una mayor proporción de CBD que de THC muestra un marcado efecto antitumoral

La presencia de CBD en preparaciones cannabinoides utilizadas como agentes antitumorales aporta, además de un efecto antitumoral por sí mismo (Massi et al., 2006), la posibilidad de reducir los efectos psicoactivos promovidos por el THC (Niesink & van Laar, 2013). Por este motivo, analizamos la acción ejercida por la combinación de TMZ con extractos cannabinoides que contienen una mayor cantidad de CBD que de THC sobre el crecimiento de tumores subcutáneos e intracraneales generados con células U87MG en ratones inmunodeficientes. Como se muestra en la **Figura R2A**, el tratamiento con preparaciones cannabinoides que contienen una mayor proporción de CBD que de THC (1:5 y 1:9) disminuyó el crecimiento de tumores subcutáneos generados con estas células de una forma similar a la que lo hizo la proporción 1:1. Además, las 3 preparaciones cannabinoides potenciaron de un modo equivalente el efecto antitumoral ejercido por la TMZ.

A continuación, quisimos determinar si estos efectos se reproducían en un modelo ortotópico generado con células U87 siguiendo el mismo protocolo que en el anterior experimento intracraneal. El tratamiento con THC:CBD (1:5) + TMZ redujo el tamaño tumoral (**Figura R2B-C**) e incrementó significativamente la supervivencia de los ratones (**Figura R2D**) actuando de un modo similar a la combinación THC:CBD (1:1) + TMZ en el experimento citado previamente (**Figura R1B-C**).

En resumen, estas observaciones sugieren que la utilización de preparaciones cannabinoides que contienen una mayor proporción de CBD que de THC produce un efecto antitumoral similar y potencia la acción de la TMZ del mismo modo que la administración de THC y CBD en relación 1:1 en tumores subcutáneos e intracraneales generados con células líneas celulares de glioma.

1.3 Efecto de los cannabinoides en cultivos enriquecidos en GICs

La población de células iniciadoras de gliomas (a la que a partir de ahora denominaremos GICs utilizando el acrónimo de su denominación en inglés “Glioma Initiating Cells”) es una subpoblación minoritaria de células presente dentro del tumor que, según se ha propuesto, podría ser responsable tanto de la elevada resistencia que muestra el GBM a agentes quimioterapéuticos como de las recidivas características de este tipo de tumores (Lathia & Mack, 2015). De esta manera, la búsqueda de nuevas terapias capaces de actuar sobre esta subpoblación celular posee un gran interés de cara a mejorar la eficacia de los tratamientos contra el GBM (Spencer et al., 2017). Así, nos preguntamos qué efecto puede tener el tratamiento con cannabinoides (y en particular de preparaciones conteniendo distintas

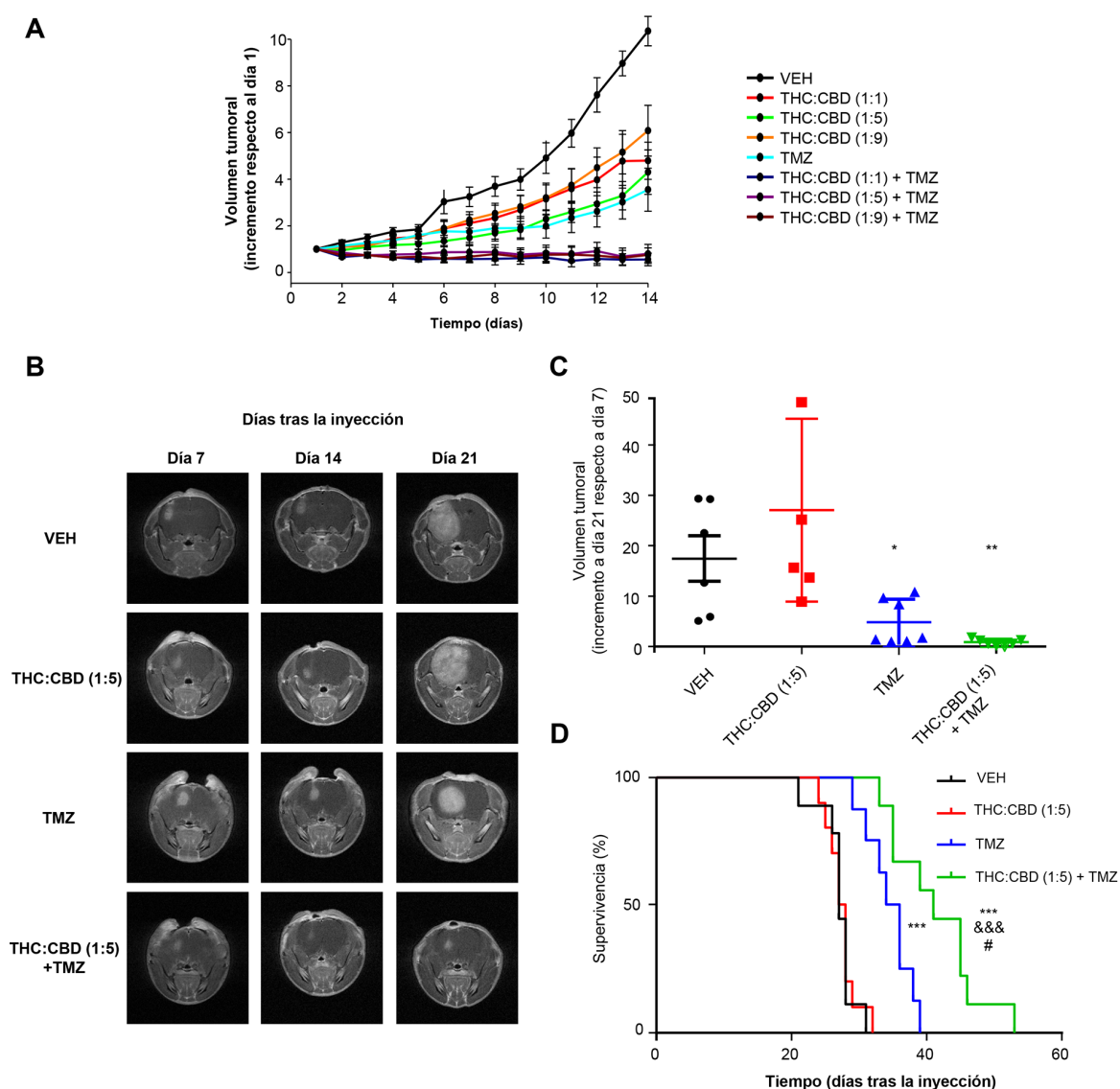


Figura R2. El tratamiento con THC:CBD (1:5) y TMZ reduce significativamente el crecimiento de tumores subcutáneos e intracraneales generados con células U87MG

(A) Efecto del tratamiento oral diario de THC:CBD (1:1) [THC (3 mg/kg) + CBD (3 mg/kg)], THC:CBD (1:5) [THC (3 mg/kg) + CBD (15 mg/kg)], THC:CBD (1:9) [THC (3 mg/kg) + CBD (27 mg/kg)] y TMZ (5 mg/kg, administración I.P.) en el crecimiento de tumores generados mediante la inyección subcutánea de 5×10^6 células U87MG (media \pm SEM, $n=6-7$ animales para condición). Los símbolos de significación se omiten por claridad. A tiempo final (día 14), todos los tratamientos fueron significativamente diferentes del VEH ($P < 0,001$). Los tumores tratados con los distintos ratios de THC:CBD + TMZ fueron significativamente diferentes de los correspondientes tumores tratados individualmente ($P < 0,01$). Los tumores tratados con THC:CBD (1:5) fueron significativamente diferentes de los tumores tratados con THC:CBD (1:9) ($P < 0,05$). **(B-C)** Efecto de la administración oral de THC:CBD (1:5) [THC-BDS (5 mg/kg) + CBD-BDS (25 mg/kg)] y TMZ (5 mg/kg, administración I.P.) en el tamaño de tumores generados mediante la inyección intracraneal de 3×10^5 células U87MG ($n=6-7$). **(B)** Imágenes representativas de RMN del tamaño tumoral a diferentes tiempos post-inyección. **(C)** Representación gráfica de los volúmenes tumorales representados como el cambio en el volumen del tumor a día 21 en relación con el día 7. Las barras incluidas en la gráfica corresponden al cambio medio en el volumen del tumor en relación con el día 7 \pm SEM; ($n=5-7$). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ respecto a los tumores tratados con VEH. **(D)** Efecto de los diferentes tratamientos sobre la supervivencia de los ratones inyectados. Los datos se representan en una gráfica de Kaplan-Meier. ($n=8-10$). *** $P < 0,001$ respecto a ratones tratados con VEH. &&& $P < 0,001$ respecto a ratones tratados con THC:CBD (1:1); # $P < 0,05$ respecto a ratones tratados con TMZ.

proporciones de THC y CBD), ya sea de manera individual o en combinación con TMZ, sobre diferentes cultivos enriquecidos en GICs y derivados de muestras de pacientes con GBM.

En primer lugar, estos cultivos se caracterizaron molecularmente. Como se muestra en la **Tabla R1**, los niveles de expresión de distintos marcadores característicos de células progenitoras neurales [y que también se expresan en células iniciadoras de cáncer o *stem-like* tumorales (Molina et al., 2014)], se encuentran significativamente incrementados en los cultivos de GICs en comparación con los niveles encontrados en cultivos de células diferenciadas derivadas de GICs.

Gen	GH2 diferenciadas	GH2 GICs	GH11 diferenciadas	GH11 GICs	12O12 diferenciadas	12O12 GICs	HCO1 diferenciadas	HCO1 GICs
SOX2	1,00±0,02	1,05±0,10	1,00±0,16	97,5±8,2 *	1,00±0,19	2,83±0,17 *	1,00±0,24	4,53±1,44 *
BMI1	1,00±0,04	2,22±0,10 *	1,00±0,14	2,06±0,18 *	1,00±0,08	2,74±0,43 *	n.d.	n.d.
MSI1	1,00±0,02	1,18±0,08 *	1,00±0,29	248,5±70,1 *	1,00±0,07	1,72±0,07 *	1,00±0,17	2,16±0,55 *
SURV	1,00±0,06	4,54±1,00 *	1,00±0,02	2,73±0,03 *	1,00±0,10	4,89±0,57 *	1,00±0,38	17,9±0,48 *
NOTCH3	1,00±0,41	10,65±4,77 *	1,00±0,05	1,90±0,22 *	1,00±0,20	1,79±0,14 *	1,00±0,04	12,7±2,04 *
HES1	1,00±0,07	6,13±1,18 *	1,00±0,07	7,20±0,52 *	1,00±0,09	2,03±0,14 *	1,00±0,26	5,49±0,51 *
NESTINA	1,00±0,05	4,80±1,89 *	1,00±0,12	5,53±1,02 *	1,00±0,35	3,89±0,23 *	1,00±0,16	2,66±0,65 *

Tabla R1. Niveles de expresión de distintos marcadores de células progenitoras neurales en cultivos de GICs y sus correspondientes células diferenciadas

Niveles de mRNA (determinados mediante qPCR) de los marcadores de células progenitoras neurales *SOX2*, *BMI1*, *MUSASHI1* (*MSI1*), *SURVIVINA* (*SURV*), *NOTCH3*, *HES1* y *NESTINA* en los cultivos de GICs GH2, GH11, 12O12 y HCO1 y en sus correspondientes células diferenciadas en presencia de suero. Los datos se expresan como media ± SEM respecto a los niveles de mRNA de cada gen en células diferenciadas. (n=3) *P <0,05. n.d: no determinado.

A continuación, seleccionamos 4 de estos cultivos (GH2, 12O12, HCO1 y GH11) de acuerdo a una bajada consistente en los niveles de expresión de la mayoría de marcadores, y comprobamos que todos ellos fueron capaces de generar tumores en ratones inmunodeficientes, bien sea de forma subcutánea o de forma intracraneal. Además, en los cultivos GH2, 12O12 y HCO1 se identificó la presencia de aquellas mutaciones que con mayor frecuencia aparecen en GBM (Brennan et al., 2013), y que se resumen en la **Tabla R2**. Para la realización de los experimentos *in vivo* seleccionamos las células 12O12, que como ya ha sido descrito por otros grupos de investigación (Pozo et al., 2013), generan tumores capaces de reproducir las características fenotípicas exhibidas por el GBM cuando son inyectados en ratones inmunodeficientes.

Tras esta caracterización, evaluamos el efecto de THC y CBD sobre el crecimiento (número total de células) de los cultivos de GICs durante dos pases consecutivos. El tratamiento individual con THC o una combinación de THC y CBD en una proporción 1:1 disminuyó ligeramente el crecimiento de cultivos de GH2 (**Figura R3A**) y GH11 (**Figura R3B**), mientras que dosis equivalentes de CBD (5 µM) eliminaron por completo las poblaciones celulares estudiadas. Estos datos sugieren que el tratamiento con cannabinoides, y en particular con CBD, podría ser efectivo para actuar sobre la población de GICs.

RESULTADOS

Células	Gen	Exón	Cambio proteína	Freq. mutación
GH2	TP53	6	p.Tyr205Asn	100%
12O12	MSH6	4	p.Leu396Val	68%
	KEL	12	p.Thr464Ile	63%
	PTEN	6	p.Gly165Glu	100%
HCO1	MSH6	9	spliceite_3	43%
	QKI	6	p.Gln259fs	62%
	TS2	11	p.Arg367Gln	61%

Células	Gen	Tipo de CNV
GH2	EGFR	Ganancia x5
12O12	CDKN2A	Delecion x0
	EGFR	Amplificación x10
HCO1	EGFR	Amplificación x9
	CDKN2A CDKN2B-AS1 CDKN2B	Delecion x0
	PTEN	Pérdida x1
	MET	Ganancia x3
	GLTSCR2 SNORD23	Pérdida x1

Tabla R2. Análisis molecular de los distintos cultivos de GICs

Detección de las principales alteraciones moleculares presentes en los cultivos de GICs derivados de muestras de pacientes con GBM siguiendo el protocolo descrito en Materiales y métodos. CNV: *Copy number variation*.

Seguidamente, analizamos si, al igual que ocurre en células diferenciadas de glioma, el tratamiento con TMZ podría incrementar la acción antiproliferativa ejercida por los cannabinoides en cultivos de GICs. Así, dada la potente acción exhibida por el CBD en este tipo de células, en primer lugar nos preguntamos si su combinación con TMZ producía un efecto sinérgico en células GH11. Como se muestra en la **Figura R3C-D**, el tratamiento combinado de CBD y TMZ no ejerció un efecto significativamente distinto que el tratamiento individual con cada uno de estos fármacos sobre el número total de células. En línea con estos resultados, trabajos publicados recientemente por nuestro grupo de investigación han demostrado que la administración oral de CBD no potencia la acción antitumoral ejercida por la TMZ sobre el crecimiento de tumores subcutáneos generados con células U87 en ratones inmunodeficientes (López-Valero et al., 2018b). Por el contrario, la combinación de THC o de THC:CBD en proporción 1:1 con TMZ inhibió de forma muy significativa el crecimiento de distintos cultivos de GICs (**Figura R3E-F**).

Estos datos sugieren que es necesaria la presencia de una cantidad mínima de THC para que los cannabinoides puedan ejercer un efecto antitumoral en combinación con TMZ tanto en células diferenciadas de glioma como en GICs.

1.4 Los cultivos de GICs poseen una elevada sensibilidad a la acción de extractos cannabinoides que poseen una mayor proporción de CBD que de THC

En base al potente efecto observado por el CBD sobre el crecimiento de distintos cultivos de GICs, decidimos analizar la acción ejercida por proporciones de cannabinoides que contienen una mayor cantidad de CBD que de THC (en particular la proporción 1:5) en combinación con TMZ sobre estas células. Como puede apreciarse en la **Figura R4A**, la administración combinada de THC y CBD (1:5) junto a TMZ redujo el número total de células GH2 de una forma significativamente mayor (y potenció en mayor medida el efecto de la TMZ) que el tratamiento con THC y CBD (1:1). Unos resultados muy similares se obtuvieron tras la incubación de células 12O12 con estos mismos compuestos, observándose de nuevo una acción más potente cuando combinamos THC:CBD 1:5 y TMZ, aunque en este caso las diferencias entre los distintos tratamientos no fueron significativas (**Figura R4B**).

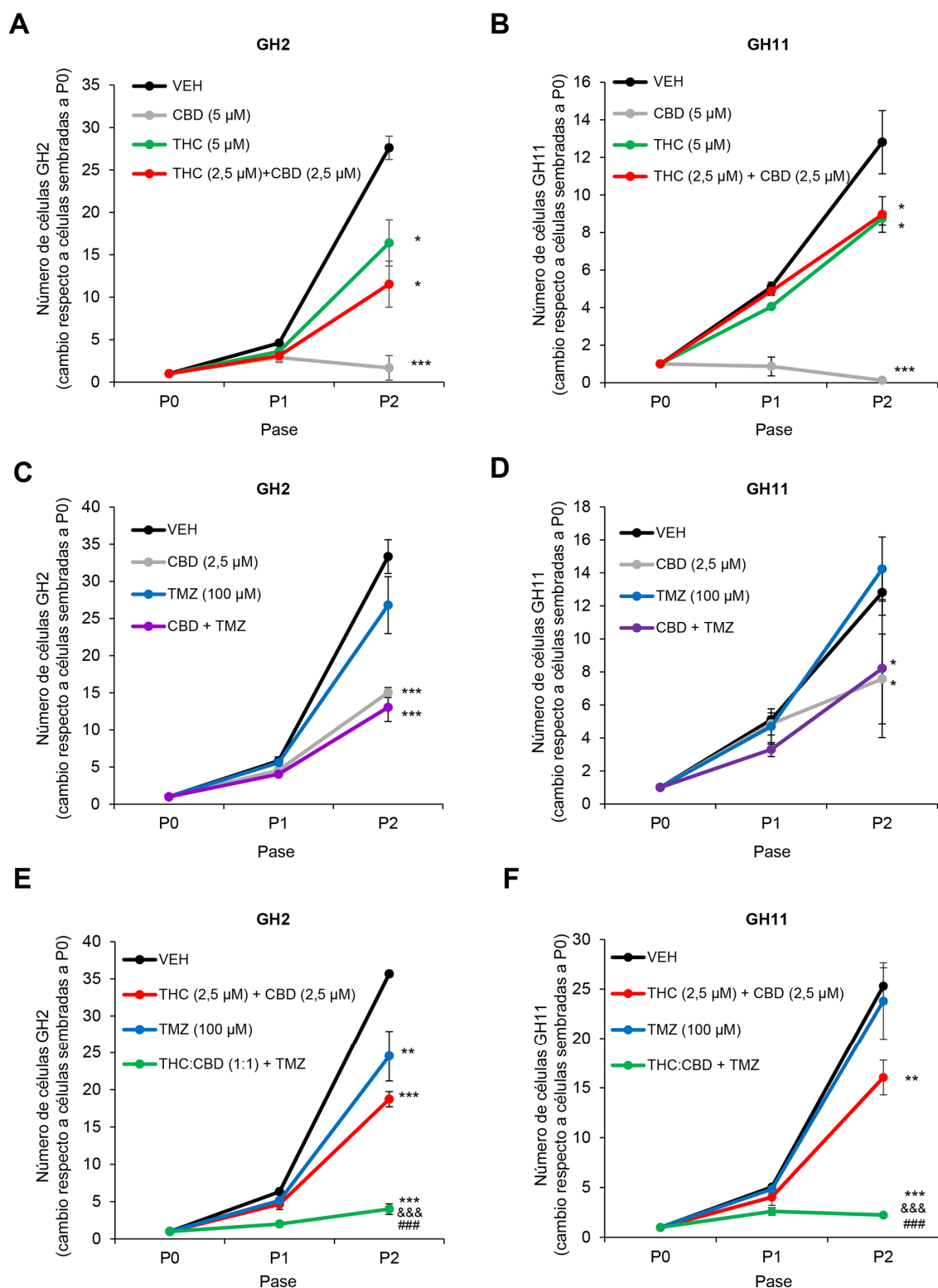


Figura R3. El tratamiento con CBD reduce fuertemente el crecimiento de distintos cultivos de GICs pero no ejerce un mayor efecto antiproliferativo en combinación con TMZ
(A-B) Efecto del tratamiento con THC, CBD, THC:CBD (1:1) y TMZ sobre el número total de células GH2 (**panel A, C, E**) y GH11 (**panel B, D, F**) durante 2 pases consecutivos. Media \pm SEM (n = 3). * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001 respecto a células tratadas con VEH; &&& P < 0,001 respecto a células tratadas con THC:CBD (1:1); ### P < 0,001 respecto a células tratadas con TMZ.

Posteriormente, quisimos determinar el efecto de estas combinaciones sobre la capacidad de auto-renovación de las GICs, una característica esencial de las células iniciadoras de tumores (Vescovi et al., 2006), mediante la realización de ensayos de dilución límite (LDA). Esta técnica ha sido ampliamente utilizada para determinar la capacidad de auto-renovación de células *stem* así como la frecuencia de iniciación tumoral tanto *in vitro* como *in vivo* (Hu & Smyth, 2009; Harford-Wright et al., 2017).

Como se muestra en las **Figuras 4C-D**, el tratamiento con THC y CBD (1:5) redujo la capacidad de auto-renovación de células GH2 y 12012 en mayor medida que el tratamiento individual de THC y CBD (1:5) + TMZ fue el tratamiento capaz de producir un efecto más potente en ambos cultivos, llegando a eliminar prácticamente por completo la capacidad de formación de nuevas neuroesferas.

En línea con estos resultados, el tratamiento con THC:CBD (1:5) activó la apoptosis en mayor medida que el tratamiento individual con la proporción 1:1 o con TMZ. De forma similar, la administración combinada de THC:CBD (1:5) y TMZ mostró unos mayores niveles de apoptosis que la combinación THC:CBD (1:1) + TMZ (**Figura R4E-F**).

1.5 La combinación de THC y CBD (1:5) + TMZ posee un efecto antitumoral más potente que la combinación de THC y CBD (1:1) + TMZ

Con la finalidad de evaluar la relevancia de estas observaciones *in vivo*, generamos tumores intracraneales mediante la inyección de células 12012 en el estriado de ratones inmunodeficientes siguiendo el protocolo descrito en la **Figura R5A**. En este caso los tratamientos comenzaron a administrarse justo después de la inyección de las células tumorales con la finalidad de poder evaluar su efecto sobre la capacidad de la población de GICs para generar tumores. Este esquema permite además reproducir de forma más precisa lo que ocurre en la práctica clínica, en la que la resección quirúrgica es incapaz de eliminar todas las células tumorales, quedando así células remanentes, entre ellas GICs, con un elevado potencial para regenerar la masa tumoral.

Como se observa en la **Figura R5B**, la administración oral de THC y CBD en proporción 1:1 o 1:5 no afectó significativamente al crecimiento de los tumores generados con GICs, determinado mediante iRMN 4 semanas después de la inyección. Sin embargo, el tratamiento con THC:CBD en proporción 1:5 sí aumentó significativamente la supervivencia de los ratones que portaban tumores ortotópicos (**Figura R5C**). Además, la combinación de ambas proporciones de THC:CBD con TMZ redujo el crecimiento tumoral e incrementó la supervivencia de los animales en mayor medida que el tratamiento individual con TMZ.

En cualquier caso, hay que destacar que como apuntaban los resultados *in vitro*, la administración de THC y CBD (1:5) en combinación con TMZ ejerció una mayor acción antitumoral (tanto reduciendo el tamaño tumoral como aumentando significativamente la supervivencia de los ratones) que el tratamiento con THC:CBD (1:1) + TMZ (**Figura R5B-C**).

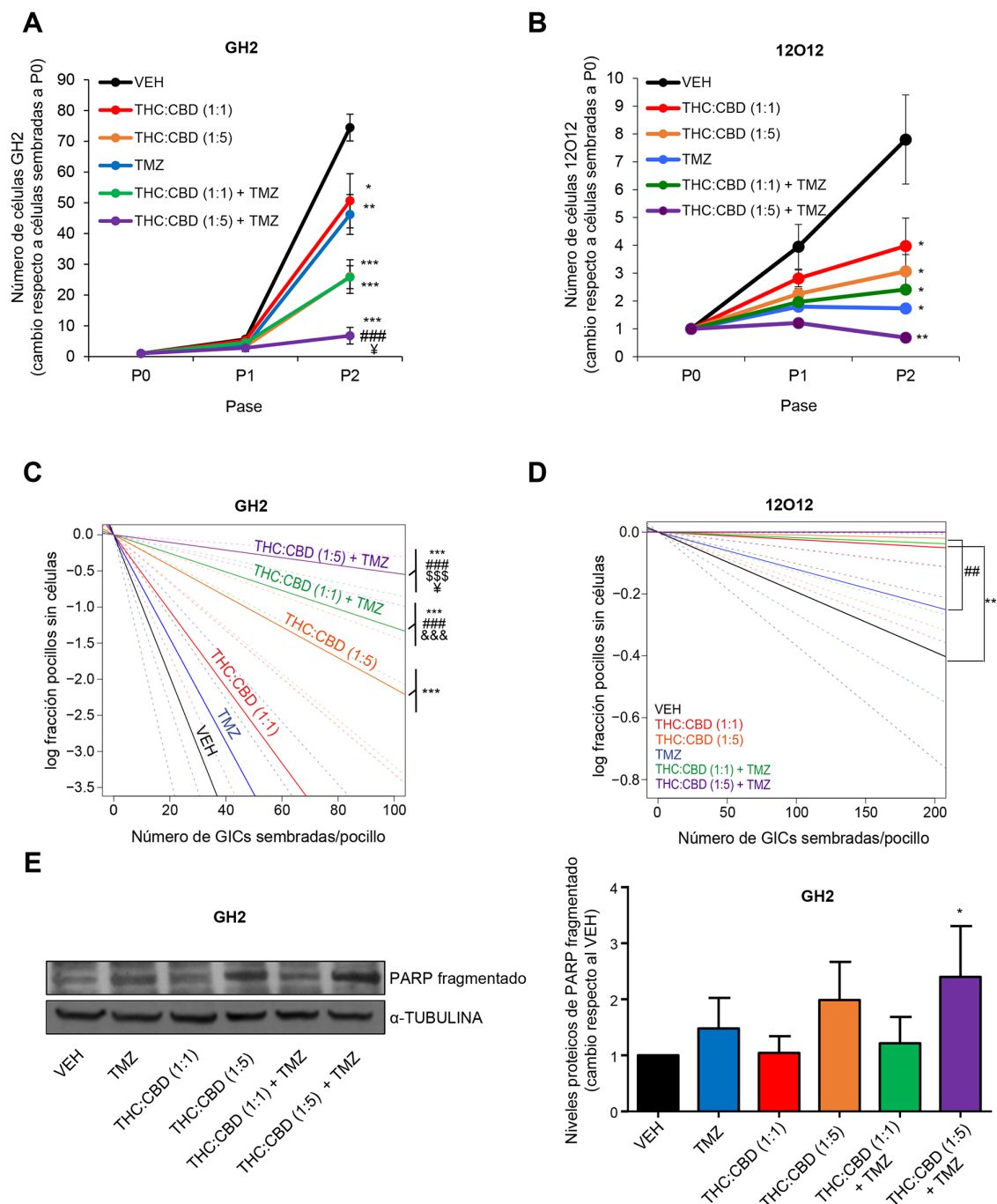


Figura R4. El tratamiento con THC:CBD (1:5) reduce el crecimiento y la capacidad de autorenovación de GICs en mayor medida que el tratamiento con THC:CBD (1:1) tanto individualmente como en combinación con TMZ

(A-B) Efecto del tratamiento con THC:CBD (1:1) [THC 2,5 μ M + CBD 2,5 μ M]; THC:CBD (1:5) [0,83 μ M THC + 4,17 μ M CBD] y TMZ (100 μ M, panel A o 20 μ M, panel B) sobre el número total de células GH2 (panel A) y 12O12 (panel B) durante 2 pases consecutivos. Media \pm SEM (n=3). **(C-D)** Efecto de los tratamientos en ensayos LDA realizados con células GH2 (panel C) y 12O12 (panel D). Se muestra un experimento representativo de n=2. **(E)** Efecto del tratamiento con THC:CBD (relación 1: 1) [THC 3,5 μ M + CBD 3,5 μ M]; THC: CBD (1: 5) [THC 1,16 μ M + 5,83 μ M CBD] y TMZ (100 μ M) en los niveles de PARP fragmentado de células GH2 (48 h). **Panel izquierdo:** Se muestra un Western Blot representativo (n=3). **Panel derecho:** Análisis densitométrico expresado como cambio en los niveles de PARP fragmentado respecto al vehículo \pm SEM. * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001 respecto a células tratadas con VEH; ## P < 0,01; ### P < 0,001 respecto a células tratadas con TMZ; &&& P < 0,001 respecto a células tratadas con THC:CBD (1:1); \$\$\$ P < 0,001 respecto a células tratadas con THC:CBD (1:5); ¥ P < 0,05 respecto a células tratadas con THC:CBD (1:1) + TMZ. Toda la información estadística adicional referente a los ensayos de LDA se muestra en el Anexo I.

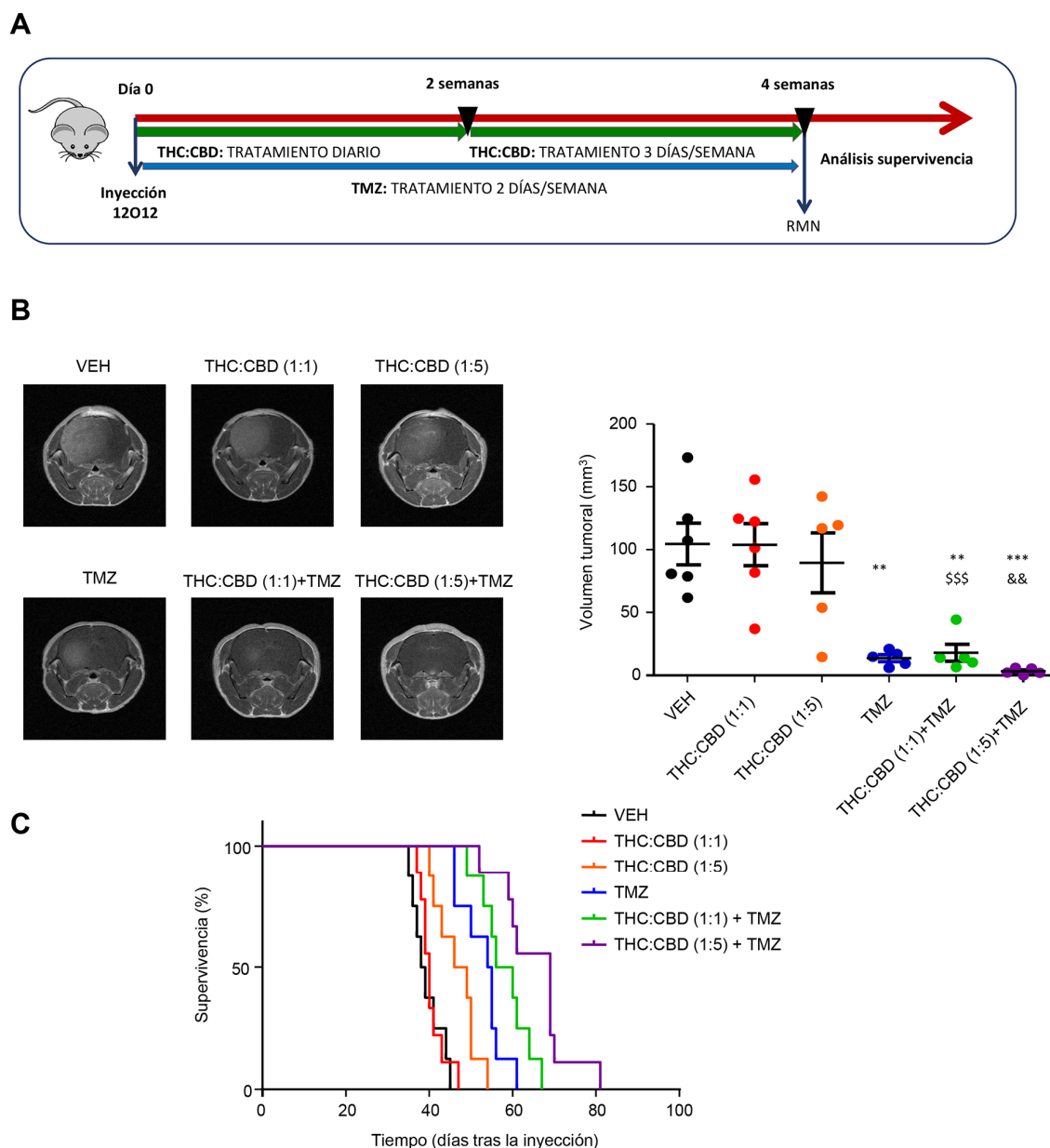


Figura R5. La combinación de THC y CBD (1:5) + TMZ posee un efecto antitumoral más potente que la combinación de THC y CBD (1:1) + TMZ

(A) Esquema del diseño experimental. **(B)** Efecto de la administración oral de THC:CBD (1:1) [THC-BDS (5 mg/kg) + CBD-BDS (5 mg/kg)] THC:CBD (1:5) [THC-BDS (5 mg/kg) + CBD-BDS (25 mg/kg)] y TMZ (5 mg/kg, I.P.) en el tamaño de tumores generados mediante la inyección intracraneal de $7,5 \times 10^4$ células 12O12 (n=6-7). **Panel izquierdo:** imágenes representativas de RMN del tamaño tumoral 4 semanas después de la inyección. **Panel derecho:** representación gráfica del volumen tumoral de cada animal (mm^3) 4 semanas después de la inyección. Media \pm SEM; (n = 5) ** P < 0,01; *** P < 0,01 respecto a los tumores tratados con VEH; \$\$\$ P < 0,001 respecto a tumores tratados con THC:CBD (1:1); && P < 0,01 respecto a tumores tratados con THC:CBD (1:5). **(C)** Efecto de los diferentes tratamientos sobre la supervivencia de los ratones inyectados. Los datos se representan en una gráfica de Kaplan-Meier. (n=8-10). Los signos de significación se omiten por claridad. Todos los tratamientos incrementaron de forma significativa la supervivencia de los animales (P < 0,01 en el caso de THC:CBD (1:5) y P < 0,001 en el caso del resto de tratamientos). La supervivencia de los animales tratados con THC:CBD (1:1) + TMZ fue significativamente diferente (P < 0,001) de la de los animales tratados con THC:CBD (1:1). El tratamiento con THC:CBD (1:5) + TMZ incrementó significativamente la supervivencia en comparación con el tratamiento individual con TMZ (P < 0,01) o con THC:CBD (1:5) (P < 0,001). El tratamiento con THC:CBD (1:5) + TMZ incrementó significativamente la supervivencia comparado con el tratamiento THC: CBD (1:1) + TMZ (P < 0,05).

Estos resultados indican que el tratamiento con preparaciones o extractos cannabinoides que contienen distintas proporciones de THC y CBD potencian la acción antitumoral ejercida por la TMZ sobre tumores derivados tanto de células U87 como de cultivos enriquecidos en GICs. En particular, nuestros hallazgos sugieren que aquellas combinaciones de cannabinoides que contienen una mayor proporción de CBD que de THC (y en particular la proporción 1:5) en combinación con TMZ son capaces de actuar más eficientemente sobre la población de GICs que las que poseen THC y CBD en una proporción 1:1 tanto *in vitro* como *in vivo*.

En conjunto, estas observaciones sugieren que la utilización de terapias basadas en el uso de medicamentos cannabinoides que contienen una mayor cantidad de CBD que de THC en combinación con el agente estándar para el tratamiento del GBM, la TMZ, puede ser de gran interés para el tratamiento de los gliomas ya que permitirían actuar también sobre la población de GICs.

- Objetivo 2: Análisis del papel del eje MDK/ALK en la regulación de la auto-renovación y la capacidad tumorigénica de las GICs

2.1 Los niveles elevados de MDK se correlacionan con un peor pronóstico en pacientes con glioma

Las observaciones llevadas a cabo previamente por nuestro grupo de investigación han mostrado que el factor de crecimiento MDK desempeña un papel esencial en la resistencia a la acción antitumoral de los cannabinoides en líneas celulares y cultivos primarios de glioma. Además, el estudio de la expresión de esta proteína en 202 muestras procedentes de pacientes con glioma (e integradas en un “*tissue micro-array*”) permitió demostrar que altos niveles de MDK se asocian con un mal pronóstico y menor supervivencia de estos pacientes (Lorente et al., 2011).

Con la finalidad de confirmar estos resultados en una colección más amplia de muestras, analizamos la información referente a la supervivencia de pacientes con glioma y niveles de expresión de MDK contenida en diferentes bases de datos de acceso público. Como se observa en la **Figura R6**, diferentes estudios revelan la existencia de una clara correlación entre altos niveles de expresión de MDK y peor pronóstico en pacientes con glioma (**Figura R6A y C**), y más específicamente, en pacientes con GBM (**Figura R6B y D-E**).

2.2 La MDK regula la capacidad de auto-renovación y formación de esferas de las GICs

Como hemos descrito con detalle en los epígrafes anteriores, se ha propuesto que la población de células iniciadoras de glioma (GICs) participa activamente en la resistencia a los tratamientos habitualmente utilizados frente al GBM, contribuyendo a las recidivas que aparecen con elevada frecuencia en aquellos pacientes que sufren este tipo de tumores. Dado que la MDK contribuye a la supervivencia, proliferación y auto-renovación de células progenitoras neurales (Zou et al., 2006; Yao et al., 2010), y que promueve el crecimiento y migración de diferentes tipos de células tumorales (Salama et al., 2006; Olmeda et al., 2017), nos planteamos analizar el posible papel oncogénico desempeñado por la MDK en la regulación y el mantenimiento de las propiedades *stem-like* de las GICs, utilizando el término que habitualmente se emplea en inglés. Estas propiedades son semejantes a las que exhiben las células progenitoras neurales y tienen que ver, entre otras, con la expresión de determinados marcadores típicos de estas células progenitoras neurales, así como con la capacidad de auto-renovación que presentan estas células.

Para ello, en primer lugar, valoramos los niveles de MDK presentes en GICs. Como se observa en la **Figura R7A**, los niveles de mRNA de MDK fueron significativamente mayores en distintos cultivos de GICs en comparación con los niveles de este factor de crecimiento en los correspondientes cultivos de células diferenciadas. Puesto que la MDK es un factor de crecimiento secretado, y una parte muy relevante de sus funciones biológicas dependen de su acción como factor soluble, analizamos también los niveles de MDK presentes en el medio de

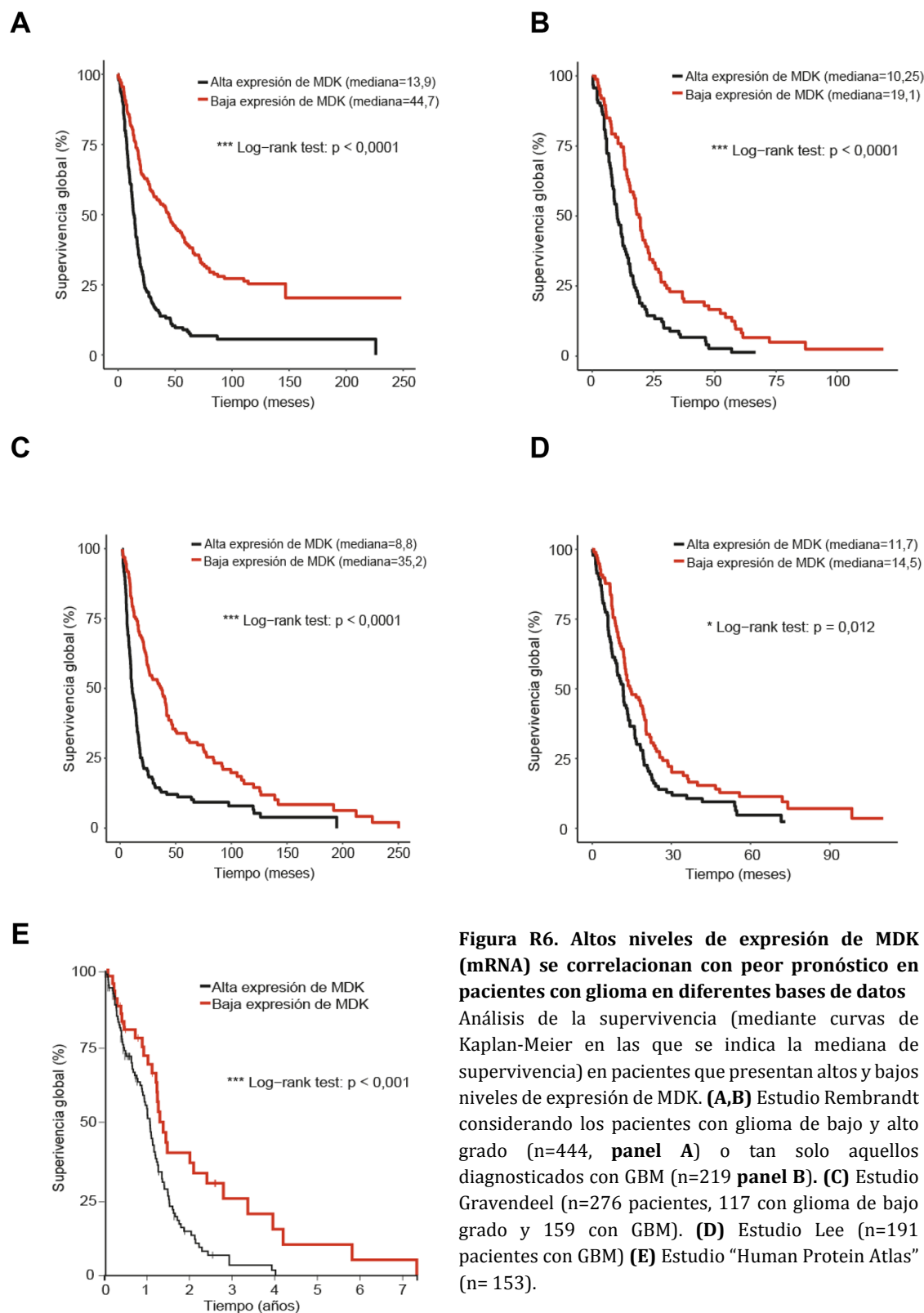


Figura R6. Altos niveles de expresión de MDK (mRNA) se correlacionan con peor pronóstico en pacientes con glioma en diferentes bases de datos

Análisis de la supervivencia (mediante curvas de Kaplan-Meier en las que se indica la mediana de supervivencia) en pacientes que presentan altos y bajos niveles de expresión de MDK. **(A,B)** Estudio Rembrandt considerando los pacientes con glioma de bajo y alto grado (n=444, **panel A**) o tan solo aquellos diagnosticados con GBM (n=219 **panel B**). **(C)** Estudio Gravendeel (n=276 pacientes, 117 con glioma de bajo grado y 159 con GBM). **(D)** Estudio Lee (n=191 pacientes con GBM) **(E)** Estudio "Human Protein Atlas" (n= 153).

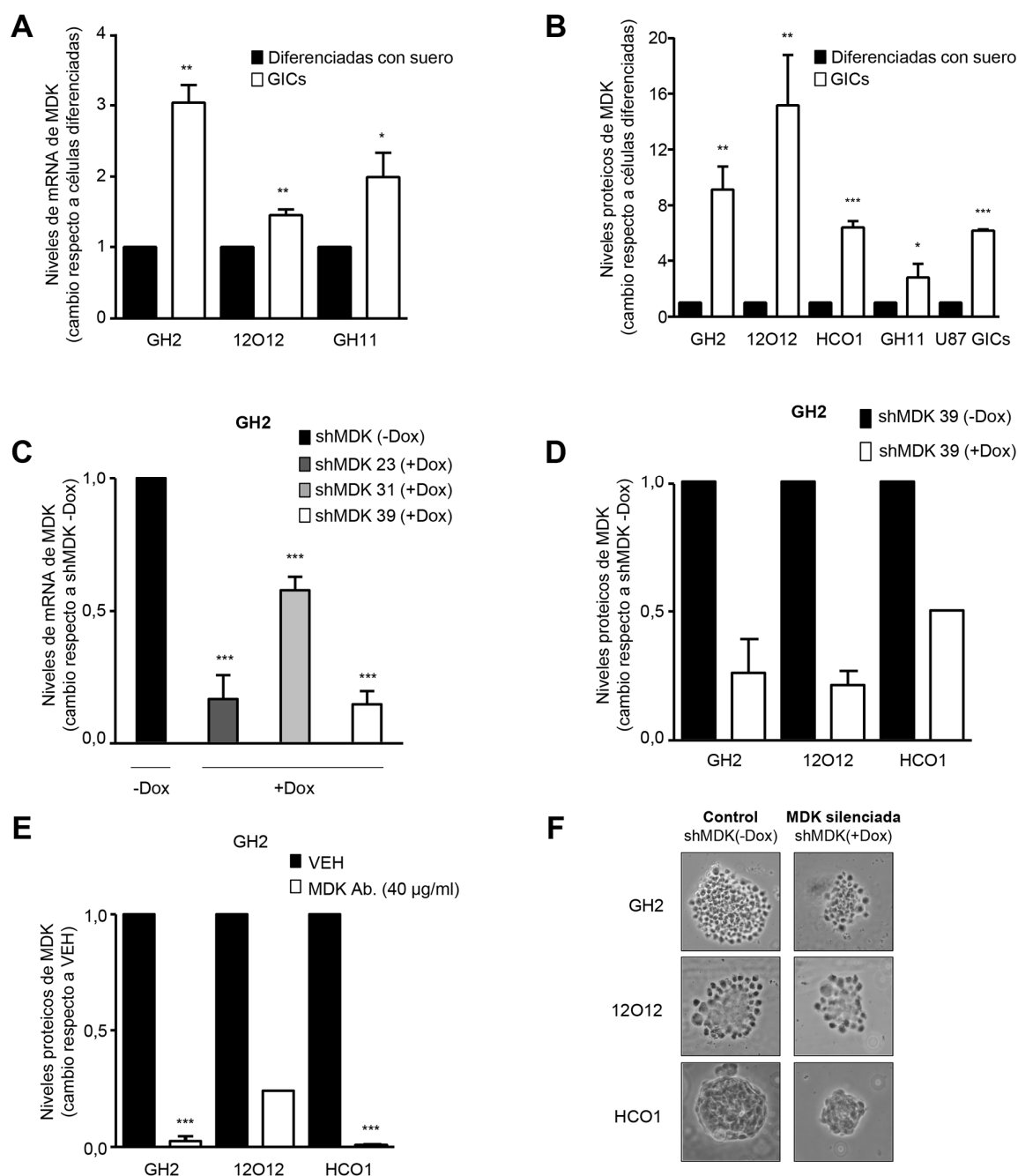


Figura R7. Los cultivos de GICs presentan unos mayores niveles de MDK que los correspondientes cultivos de células diferenciadas derivados de ellas

(A) Niveles de mRNA de MDK (determinados mediante qPCR) en cultivos de GICs y en sus correspondientes células diferenciadas en suero (media \pm SEM, $n=3$). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$. **(B)** Niveles proteicos de MDK (determinados mediante ELISA) en cultivos de GICs y en sus correspondientes células diferenciadas en suero (media \pm SEM respecto a los niveles de proteicos en células diferenciadas, $n=3$). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. **(C)** Efecto del silenciamiento de MDK sobre los niveles de mRNA de MDK (determinados mediante qPCR) tras el tratamiento con doxiciclina (+Dox) de células GH2 transducidas de manera estable con tres *shMDK* distintos (23, 31 y 39) inducibles con doxiciclina (media \pm SEM, $n=3$). *** $P < 0,001$. **(D)** Efecto del silenciamiento de MDK sobre los niveles de mRNA (determinados mediante qPCR) de células GH2, 12O12 y HCO1 transducidas con el *shMDK* inducible 39 (media \pm SEM respecto a los niveles de mRNA en células no tratadas con Dox, $n=2-3$). *** $P < 0,001$. **(E)** Efecto del tratamiento con un anticuerpo neutralizante de MDK (MDK Ab., 24h.) sobre los niveles proteicos de MDK (determinados mediante ELISA) en células GH2, 12O12 y HCO1 (media \pm SEM respecto a los niveles de MDK en células VEH, $n=2-3$). *** $P < 0,001$. **(F)** Imágenes representativas de distintos cultivos de GICs (GH2, 12O12 y HCO1) transducidos de forma estable con el *shRNA39* selectivo para MDK inducible por doxiciclina (*shMDK*).

distintos cultivos de GICs. Así, encontramos que los sobrenadantes procedentes de distintos cultivos de GICs presentaban un mayor contenido de MDK que los sobrenadantes procedentes de las células diferenciadas (**Figura R7B**).

A continuación, y con la finalidad de evaluar si la disminución en los niveles de MDK puede tener consecuencias funcionales en la biología de las GICs, utilizamos distintas aproximaciones para inhibir la señalización dependiente de este factor de crecimiento. Por un lado, silenciamos la expresión de MDK mediante la transducción de distintos cultivos de GICs con partículas lentivirales que expresan un *shRNA* inducible con doxiciclina específico frente a MDK, y comprobamos que tres *shRNAs* distintos fueron capaces de disminuir significativamente los niveles de expresión de este factor de crecimiento en células GH2 (**Figura R7C**). Posteriormente, seleccionamos el *shRNA* que mostró una mayor eficacia de silenciamiento (*shMDK39*) para infectar también las células 12012 y HC01, en las que corroboramos que la transducción con este *shRNA* (de aquí en adelante denominado *shMDK*) redujo significativamente los niveles de MDK detectados en el medio procedente de estas células (**Figura R7D**).

Por otro lado, como una aproximación adicional para bloquear la acción de la MDK, utilizamos anticuerpos específicos diseñados frente al N terminal de la proteína con capacidad de neutralizar a este factor de crecimiento (denominados de forma general MDK Ab.). Así, corroboramos que la incubación con MDK Ab. fue capaz de eliminar prácticamente por completo la MDK presente en el medio de cultivos de GICs (**Figura R7E**) por lo que también seleccionamos esta aproximación para desarrollar experimentos en los que analizar el papel de la MDK en GICs. Como se muestra en la **Figura R7F**, la inhibición genética de MDK disminuyó el tamaño de las neuroesferas generadas con cultivos de células GH2, 12012 y HC01. Del mismo modo, tanto la inhibición genética como farmacológica de MDK redujo notablemente el número total de células en estos mismos cultivos durante dos pases consecutivos (**Figura R8A**).

Para conocer más en profundidad si la MDK puede ser relevante en la regulación de la capacidad de auto-renovación de las GICs, llevamos a cabo ensayos de LDA con estas células. El bloqueo genético (**Figura R8B**) o farmacológico (**Figura R8C**) de MDK inhibió significativamente la capacidad de auto-renovación de los tres cultivos de GICs analizados. Esta reducción en la habilidad para generar esferas se correlacionó con una clara disminución en los niveles de expresión de un amplio panel de marcadores de células progenitoras neurales tras la incubación prolongada con un anticuerpo neutralizante de MDK (**Figura R9A**) o su silenciamiento genético inducido por el tratamiento con doxiciclina durante 2 pases consecutivos (**Figura R9B-D**). En la **Figura R9E** se representa el porcentaje de estos genes cuyos niveles de expresión se encuentran significativamente disminuidos con respecto a las células control tras el bloqueo genético o farmacológico de MDK en distintos cultivos de GICs.

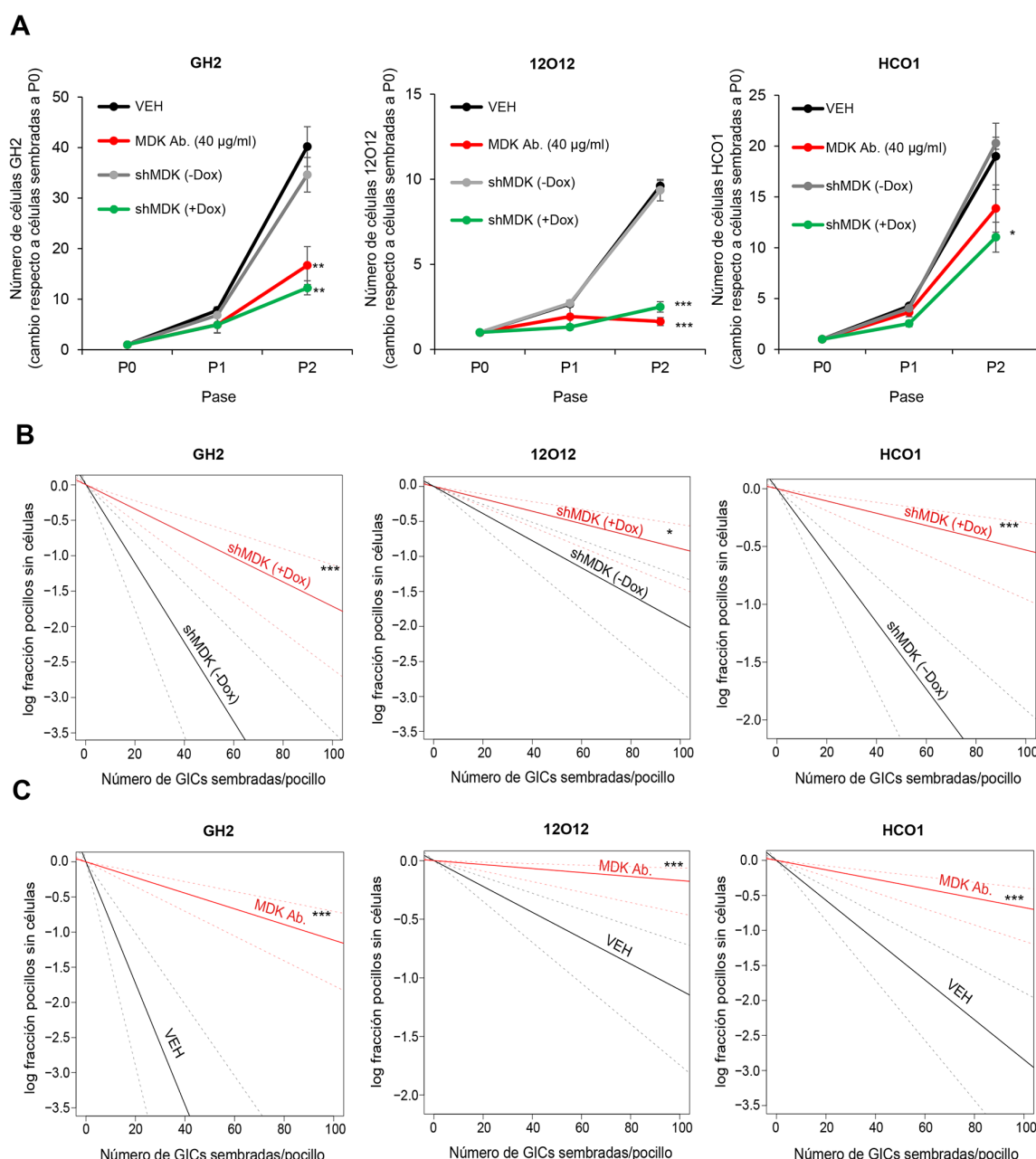


Figura R8. La inhibición genética o farmacológica de MDK reduce el crecimiento y la capacidad de auto-renovación de distintos cultivos de GICs

(A) Efecto del silenciamiento de MDK (tras el tratamiento con doxiciclina (+Dox) de células GH2, 12O12 y HCO1 transducidas de manera estable con un *shMDK* inducible) o de la incubación con un anticuerpo neutralizante de MDK (MDK Ab.) sobre el número total de células GH2, 12O12 y HCO1 durante 2 pases consecutivos. Media \pm SEM (n=3). **(B-C)** Efecto del silenciamiento de MDK (tras tratamiento con Dox, **panel B**) o de la incubación con anticuerpos neutralizantes de MDK (MDK Ab., 5 días, **panel C**) en la capacidad de auto-renovación (determinada mediante ensayos de LDA) de células GH2, 12O12 y HCO1. Se muestra un experimento representativo (n=2).

*P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001 respecto a *shMDK* (-Dox) o VEH.

Del mismo modo, la inhibición farmacológica (**Figura R10A**) o genética (**Figura R10B**) de MDK redujo el número de células NESTINA positivas (uno de los marcadores más característicos de células progenitoras neurales, y que se encuentra expresado frecuentemente en GICs) (Calabrese et al., 2007) presentes en cultivos GH2 y HCO1 respectivamente. Igualmente, tanto los niveles proteicos de NESTINA como de MUSASHI-1 (MSI1, otro marcador de

RESULTADOS

precursores neurales habitualmente utilizado para identificar la población de GICs)(Molina et al., 2014), disminuyeron de forma muy evidente en lisados procedentes de células GH2 tras el tratamiento con anticuerpos neutralizantes de MDK (**Figura R17E**).

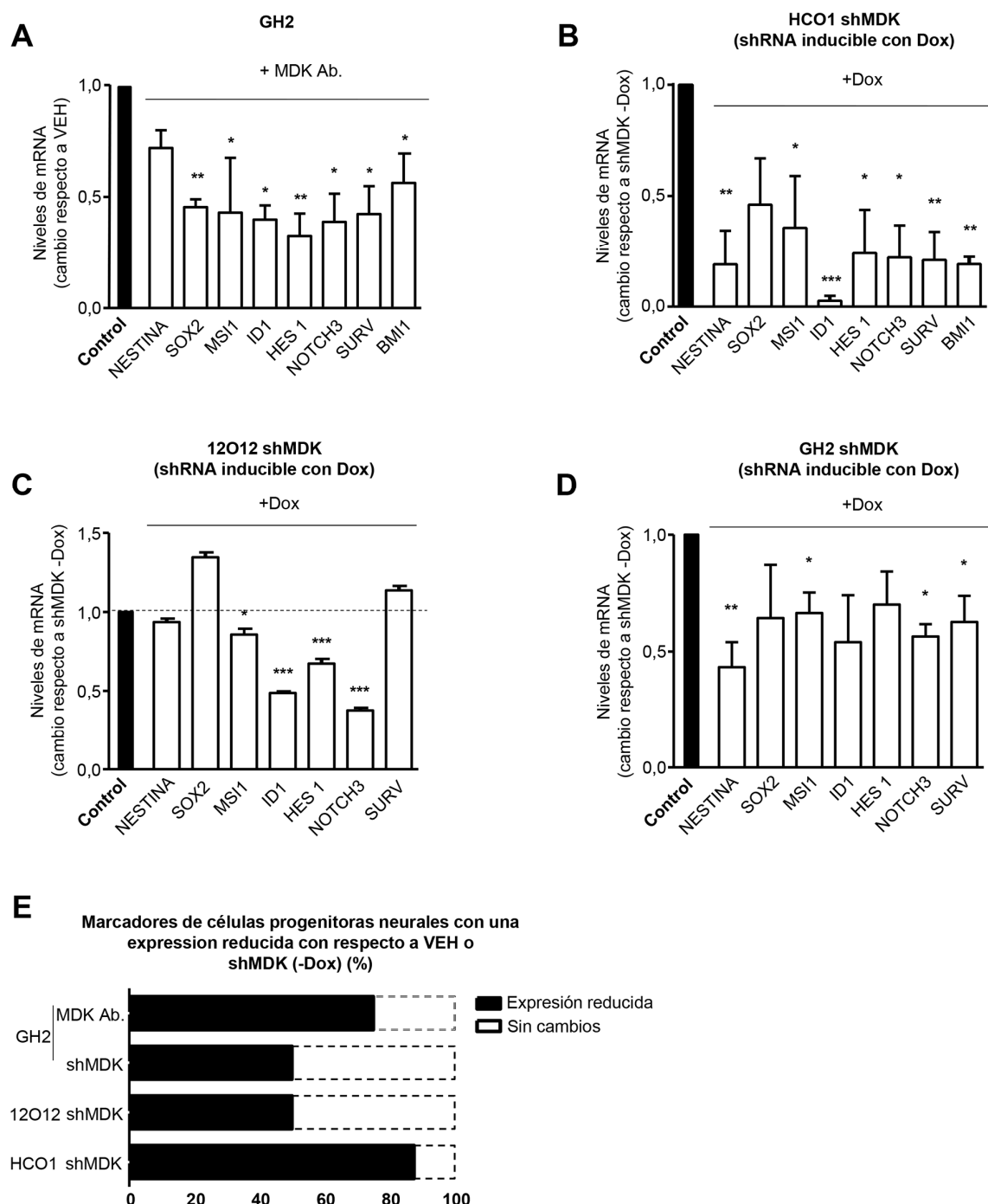


Figura R9. La inhibición genética o farmacológica de MDK reduce los niveles de expresión de marcadores característicos de células progenitoras

(A) Efecto de la incubación con un anticuerpo neutralizante de MDK (MDK Ab. 40 μ g/ml; 72h. **panel A**) o del silenciamiento de MDK (tras el tratamiento con doxíciclina, +Dox, **panel B-D**) en los niveles de mRNA (determinados mediante qPCR) de un panel de genes característicos de células progenitoras neurales en células GH2, 12O12 y HCO1 (media \pm SEM). *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0,001 respecto al VEH o shMDK (-Dox)(Control) (E) Porcentaje de marcadores regulados a la baja después de la inhibición genética o farmacológica de MDK en diferentes cultivos de GICs.

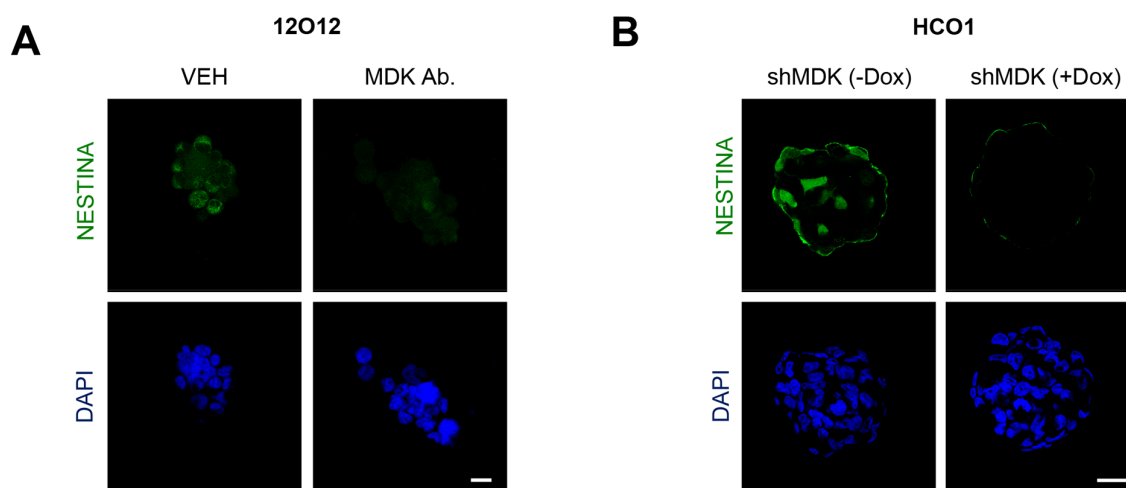


Figura R10. La inhibición genética o farmacológica de MDK reduce los niveles de expresión de marcadores de células progenitoras neurales

(A) Efecto de la incubación con un anticuerpo neutralizante de MDK (MDK Ab, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 72h) en los niveles de expresión de NESTINA (determinados mediante inmunofluorescencia) de células 12O12. Barra de escala: 20 μm . **(B)** Efecto del silenciamiento de MDK tras el tratamiento con doxiciclina (+Dox) en los niveles de expresión de NESTINA (determinados mediante inmunofluorescencia) de células HCO1 transducidas de manera estable con un *shMDK* inducible. Barra de escala: 20 μm .

Estos datos sugieren que la MDK estimula la capacidad de proliferación y auto-renovación en distintos cultivos de GICs y contribuye al mantenimiento de las propiedades *stem-like* de estas células.

2.3 La MDK desempeña un papel relevante en la gliomagénesis

Para determinar si la MDK participa en el origen y la generación de gliomas, llevamos a cabo 2 aproximaciones distintas *in vivo*:

2.3.1 Efecto del silenciamiento genético de MDK en tumores intracraneales generados con células 12O12

En esta primera aproximación, evaluamos la capacidad tumorigénica de cultivos de GICs mediante la inyección intracraneal de células 12O12 que expresan un *shRNA* selectivo frente a MDK e inducible por doxiciclina en el estriado de ratones inmunodeficientes siguiendo el protocolo descrito en la **Figura R11A**. El silenciamiento de MDK (**Figura R11B**) retrasó la aparición (**Figura R11C**) e inhibió el crecimiento (**Figura R11D**) de los tumores generados. En línea con estos datos, el bloqueo de MDK también incrementó de forma significativa la supervivencia de los ratones inyectados con estas células (**Figura R11E**).

Hay que destacar que el tratamiento con doxiciclina no modificó de forma significativa el número total de células (**Figura R12A**), la capacidad de auto-renovación (**Figura R12B**) ni la expresión de marcadores asociados a células progenitoras neurales (**Figura R12C**) de células GH2 o 12O12 infectadas con un *shRNA* control (*shC*) inducible por doxiciclina. El tratamiento con este antibiótico tampoco indujo cambios en la supervivencia de ratones

RESULTADOS

inmunodeficientes inyectados intracranealmente con células 12O12 *shC* (**Figura R12D**), confirmando así que los efectos exhibidos por el *shRNA* inducible frente a MDK utilizado en nuestros experimentos se deben al silenciamiento efectivo de MDK y no al tratamiento con la doxiciclina.

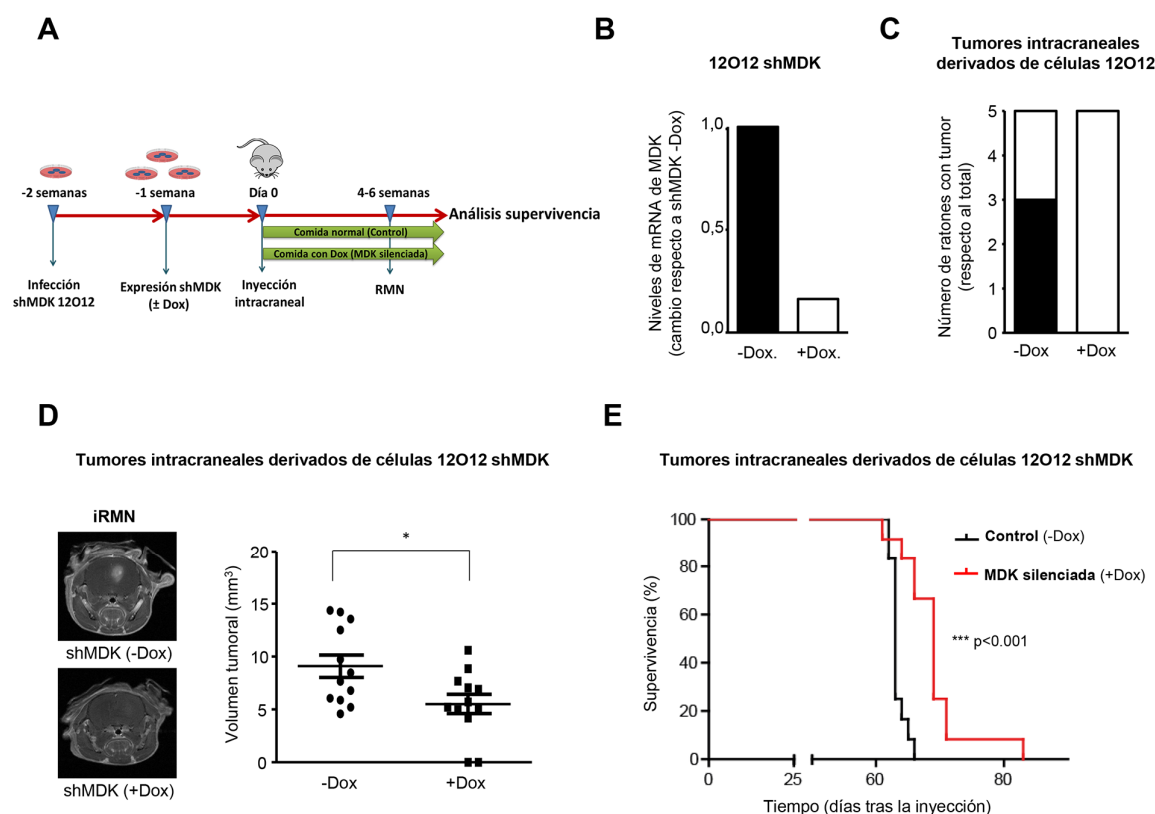


Figura R11. El silenciamiento genético de MDK retrasa el crecimiento de tumores intracraneales generados con GICs e incrementa la supervivencia de los ratones portadores de dichos tumores

(A) Esquema que representa el procedimiento empleado para generar tumores intracraneales mediante la inyección de $7,5 \times 10^4$ células 12O12 transducidas de manera estable con un *shMDK* inducible en el estriado de ratones inmunodeficientes. (B) Efecto de la inhibición genética de MDK [mediante la inducción de la expresión del *shMDK* inducible por doxiciclina (+Dox)] en los niveles proteicos de MDK (determinados mediante ELISA) presentes en el medio de células 12O12 *shMDK* 24 horas antes de su inyección intracraneal. (C) Efecto de la inhibición genética de MDK [mediante la inducción de la expresión del *shMDK* inducible por doxiciclina (+Dox)] en el número de ratones inmunodeficientes en los que se detecta crecimiento tumoral mediante imagen de RM (iRMN) (representados por la barra negra) 4 semanas después de la inyección (n=5). (D) Efecto de la inhibición genética de MDK sobre el tamaño de tumores intracraneales (determinado mediante iRMN) generados con células 12O12 *shMDK* (n=12 animales por condición experimental). **Panel izquierdo:** Imágenes representativas de RMN de cada condición experimental 6 semanas después de la inyección. **Panel derecho:** Representación gráfica del volumen tumoral de cada animal (mm^3) 6 semanas después de la inyección. Media \pm SEM. * $P < 0,05$ respecto a 12O12 *shMDK* (-Dox). (E) Efecto de la inhibición genética de MDK en la supervivencia de los ratones portadores de estos tumores. Los datos se representan en una gráfica de Kaplan-Meier (n=12 animales por condición experimental). *** $P < 0.001$ respecto a la supervivencia de los ratones inyectados con células 12O12 *shMDK* (-Dox).

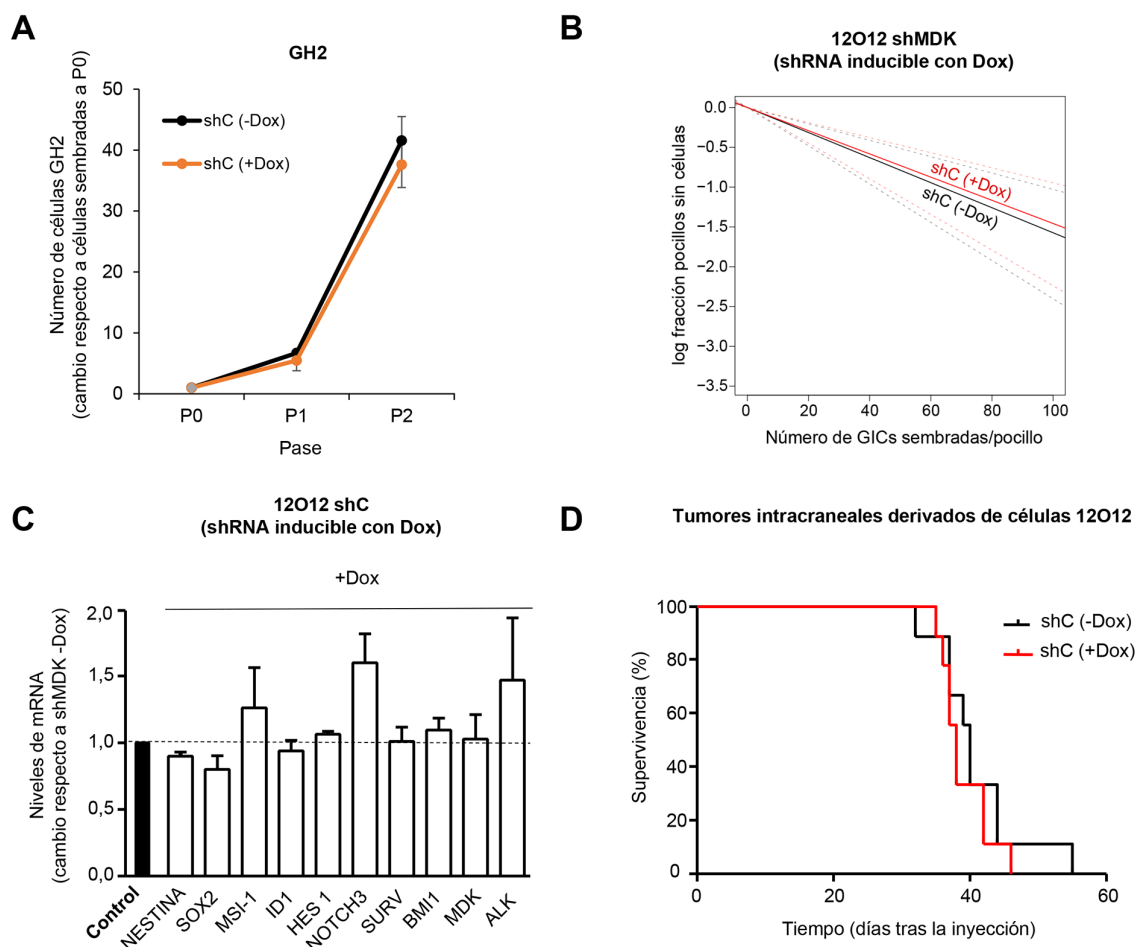


Figura R12. El tratamiento con doxiciclina (Dox) no modifica ninguno de los parámetros estudiados en cultivos de GICs

(A) Efecto del tratamiento con doxiciclina (+Dox) sobre el número total de células GH2 transducidas de manera estable con un *shC* inducible (n=3). **(B-C)** Efecto del tratamiento con doxiciclina (+Dox) sobre la capacidad de auto-renovación (determinada mediante ensayos de LDA, **panel B**), los niveles de mRNA (determinados mediante qPCR) de un panel de genes característicos de células progenitoras neurales (**panel C**) de células 12O12 transducidas de manera estable con un *shC* inducible (n=2). **(D)** Efecto del tratamiento con doxiciclina (+Dox) sobre la supervivencia de ratones inmunodeficientes inyectados con $7,5 \times 10^4$ células 12O12 transducidas de manera estable con un *shC* inducible (n=9). Los datos se representan en una gráfica de Kaplan-Meier.

2.3.2 Efecto de la sobre-expresión de MDK en el modelo transgénico *Nestina-Tva*

Como segundo abordaje experimental para estudiar la relevancia de la MDK en la gliomagénesis, utilizamos el modelo transgénico *Nestina-Tva* que, como se ha explicado con detalle en el apartado de Introducción de esta tesis, permite evaluar el efecto de la sobre-expresión o delección de varios genes de forma tejido-específica. Estudios previos con este modelo han demostrado que la sobre-expresión de PDGFB en un fondo genético no mutado genera oligodendrogliomas de bajo grado (Dai et al., 2001)(Shih et al., 2004). Basándonos en estos datos, decidimos evaluar si la sobre-expresión de MDK, en combinación con la sobre-expresión de PDGFB, podría acelerar la generación de gliomas así como incrementar el grado, la malignidad o la penetrancia de los tumores generados. Para ello, las células DF-1 se transfectaron con plásmidos RCASY que sobre-expresan PDGFB-HA o MDK humanos. En

primer lugar, comprobamos la sobre-expresión de nuestras proteínas de interés *in vitro*. Como se observa en la **Figura R13A**, en las células DF-1 transfectadas con el plásmido RCASY-PDGFB-HA detectamos altos niveles de HA mediante Western blot. Por su parte, los niveles de MDK en el medio procedente de células DF-1 transfectadas con el plásmido RCASY-MDK, fueron significativamente más elevados que los encontrados en el medio procedente de células DF-1 transfectadas con un RCASY-control (**Figura R13B**). Este incremento en los niveles de MDK fue notablemente mayor tras varios pases celulares, confirmando que los virus liberados pueden auto-infectar otras células DF-1 *in vitro*, contribuyendo así a aumentar los niveles de MDK secretados al medio.

Posteriormente, estas células DF-1 se inyectaron en el cerebro de ratones *Nestina-Tva* recién nacidos, que fueron sacrificados 14 semanas después siguiendo el protocolo descrito por otros grupos de investigación. El análisis histopatológico de los cerebros extraídos de estos ratones reveló la existencia de oligodendrogliomas de grado II/III tan solo en el grupo experimental en el que se sobre-expresaron PDGFB y MDK, y en concreto en 2 de los 7 ratones pertenecientes a este grupo (**Figura R13C**). El resto de cerebros analizados no mostró ninguna alteración estructural o morfológica significativa. Además, tan solo encontramos una tinción positiva para HA y para MDK (**Figura R13C**) en la región tumoral presente en el cerebro de estos 2 ratones, lo que refleja que la sobre-expresión tanto de PDGFB como de MDK está directamente implicada en la generación de estos tumores. Aunque preliminares, los datos obtenidos utilizando el modelo transgénico *Nestina-Tva* sugieren que la MDK participa en la inducción y generación de gliomas a partir de células progenitoras.

En conjunto, todos estos resultados demuestran que la MDK desempeña un papel relevante en la regulación de las propiedades tumorigénicas de las GICs y apoyan firmemente la idea de que este factor de crecimiento puede desempeñar un papel relevante en el control de la gliomagénesis.

2.4 La MDK regula las propiedades *stem-like* de las GICs mediante la estimulación del receptor ALK

La MDK promueve la tumorigénesis mediante su interacción con distintos receptores, entre ellos ALK, cuya activación dependiente de MDK estimula la supervivencia y la proliferación en distintas células tumorales (Wellstein, 2012; Kadomatsu et al., 2013; Sun et al., 2017), incluidos los gliomas (Stoica et al., 2002). En particular, resultados publicados previamente por nuestro grupo de investigación han demostrado que la MDK promueve la resistencia a la acción antitumoral de los cannabinoides en líneas celulares y cultivos primarios de glioma mediante la estimulación del receptor ALK (Lorente et al., 2011).

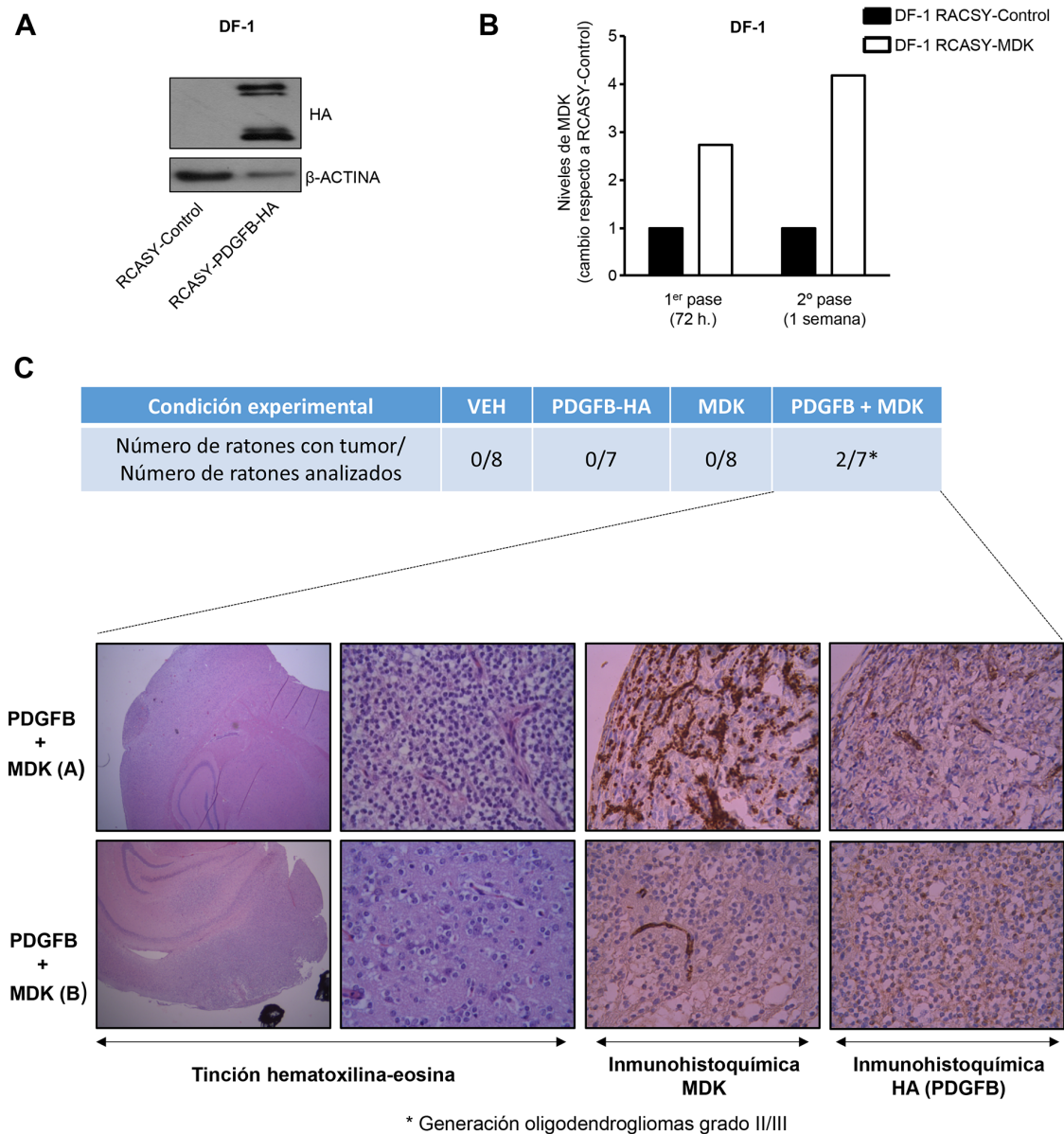


Figura R13. La sobre-expresión de MDK promueve la generación de oligodendrogliomas en el modelo transgénico *Nestina-Tva*

(A) Efecto de la transfección de células DF-1 con los vectores RCASY-Control y RCASY-PDGFB-HA (72h.) sobre los niveles de expresión de HA determinados mediante Western blot. Se muestra un Western blot representativo para $n=2$. **(B)** Efecto de la transfección de células DF-1 con los vectores RCASY-Control y RCASY-MDK sobre los niveles proteicos de MDK (determinados mediante ELISA) a distintos tiempos tras la transfección y de forma previa a su inyección intracraneal. **(C) Panel superior:** Análisis histopatológico mediante tinción con hematoxilina-eosina de los cerebros obtenidos 3 meses y medio después de la inyección de células DF-1 en ratones transgénicos NES-TVA. En la tabla se representa el número de animales que desarrollan tumor al tiempo establecido respecto al número total de animales analizados en cada condición experimental. **Panel inferior:** Imágenes representativas de los cerebros pertenecientes a los 2 ratones (A y B) con tumores tras la tinción inmunohistoquímica con hematoxilina-eosina, MDK y HA.

En línea con estos datos observamos que, al igual que ocurre con la MDK, los niveles proteicos del receptor ALK se encuentran incrementados en distintos cultivos de GICs en comparación con sus correspondientes células diferenciadas **(Figura R14A)**. Además, la adición de MDK

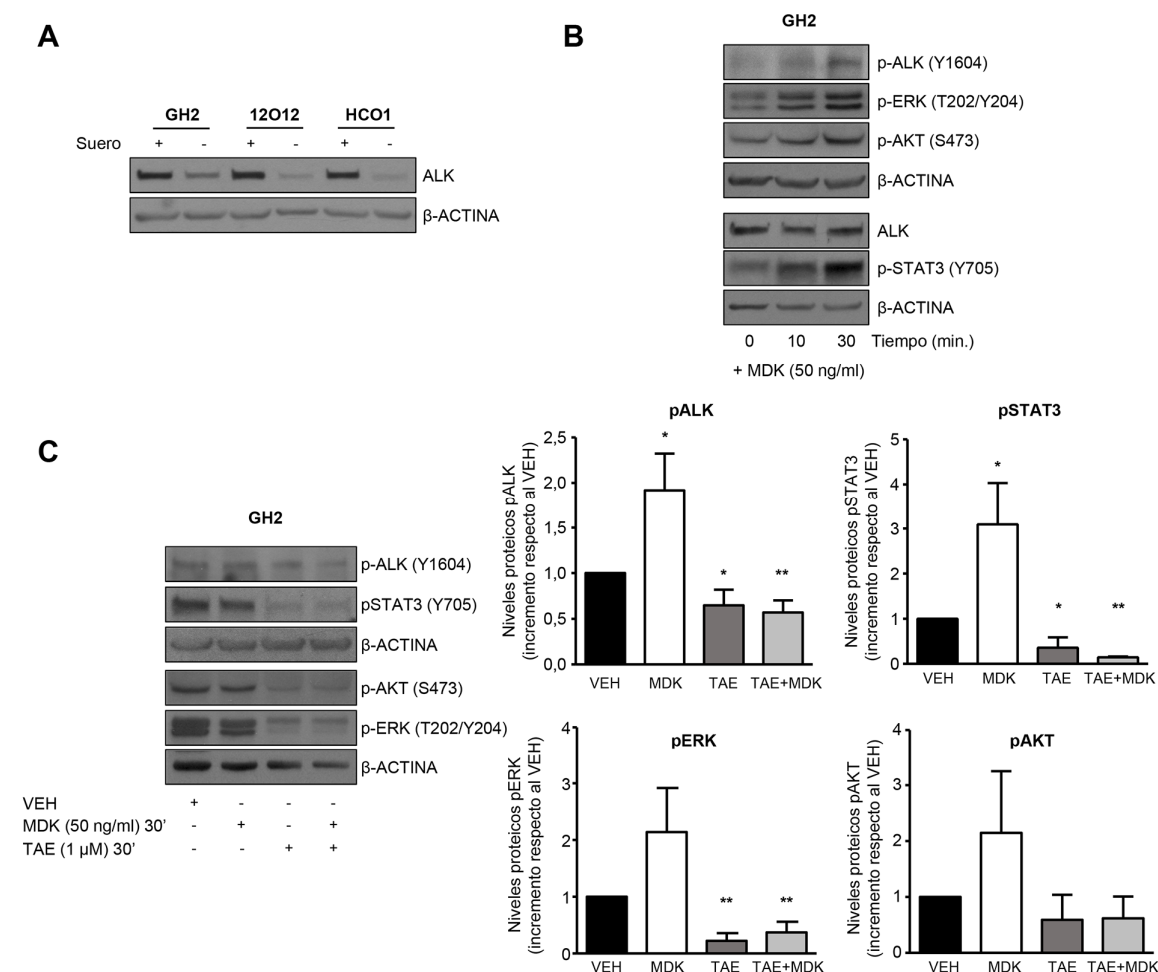


Figura R14. La MDK regula las propiedades “stem-like” de las GICs mediante la estimulación del receptor ALK

(A) Niveles proteicos de ALK (determinados mediante Western blot) en diferentes cultivos de GICs y sus correspondientes células diferenciadas en suero. Se muestra un Western blot representativo (n=3). **(B)** Efecto del tratamiento con MDK exógena (MDK, 50 ng/ml) en los niveles de fosforilación de ALK, STAT3, AKT y ERK de células GH2. Se muestra un Western blot representativo (n=6). **(C)** Efecto del tratamiento con MDK exógena (MDK, 50 ng/ml, 30 min.) y TAE (1 μM, 30 min.) en los niveles de fosforilación de ALK, STAT3, AKT y ERK de células GH2. **Panel izquierdo:** se muestra un experimento representativo (n=4). **Panel derecho:** Análisis densitométrico de los niveles de fosforilación de las distintas proteínas. Los datos se representan como la relación entre los niveles de proteína fosforilada y los niveles de proteína utilizados como control de carga (β-ACTINA) para cada condición experimental relativa al VEH (media ± SEM). * P < 0,05 y ** P < 0,01 respecto al VEH.

exógena incrementó de forma significativa tanto la fosforilación del receptor ALK como de sus principales proteínas dianas de regulación (STAT3, ERK y AKT) en células GH2 (**Figura R14B**), un efecto que se previno tras la pre-incubación de estas células con TAE (**Figura R14C**), un potente inhibidor específico de ALK (Galkin et al., 2007). Estas observaciones indican que la MDK activa el receptor ALK en GICs y que la acción ejercida por la MDK en estas células se debe, al menos en gran medida, a su interacción con este receptor.

A continuación, analizamos la función desempeñada por ALK en el mantenimiento de las propiedades *stem-like* de las GICs, para lo que inhibimos este receptor tanto genética como farmacológicamente. Para ello, silenciamos su expresión mediante la transducción de células

12O12 con partículas lentivirales que expresan 2 *shRNAs* específicos frente a ALK (*shALK03* y *shALK06*) inducibles con doxiciclina. Como se muestra en la **Figura R15A**, la transducción con *shALK03* redujo de forma marcada los niveles proteicos de este receptor. De esta manera, el *shALK03* (de aquí en adelante denominado *shALK*) fue seleccionado para llevar a cabo todos los experimentos de inhibición genética de ALK tanto en células 12O12 como en células GH2. Del mismo modo, la incubación de estas células con inhibidores de la actividad tirosina-quinasa de ALK con diferente especificidad por el receptor (TAE, crizotinib y lorlatinib) redujo de forma notable sus niveles de fosforilación en células GH2 o 12O12, como se observa en la **Figura R15B-C** y previamente se ha mostrado en la **Figura R14C**.

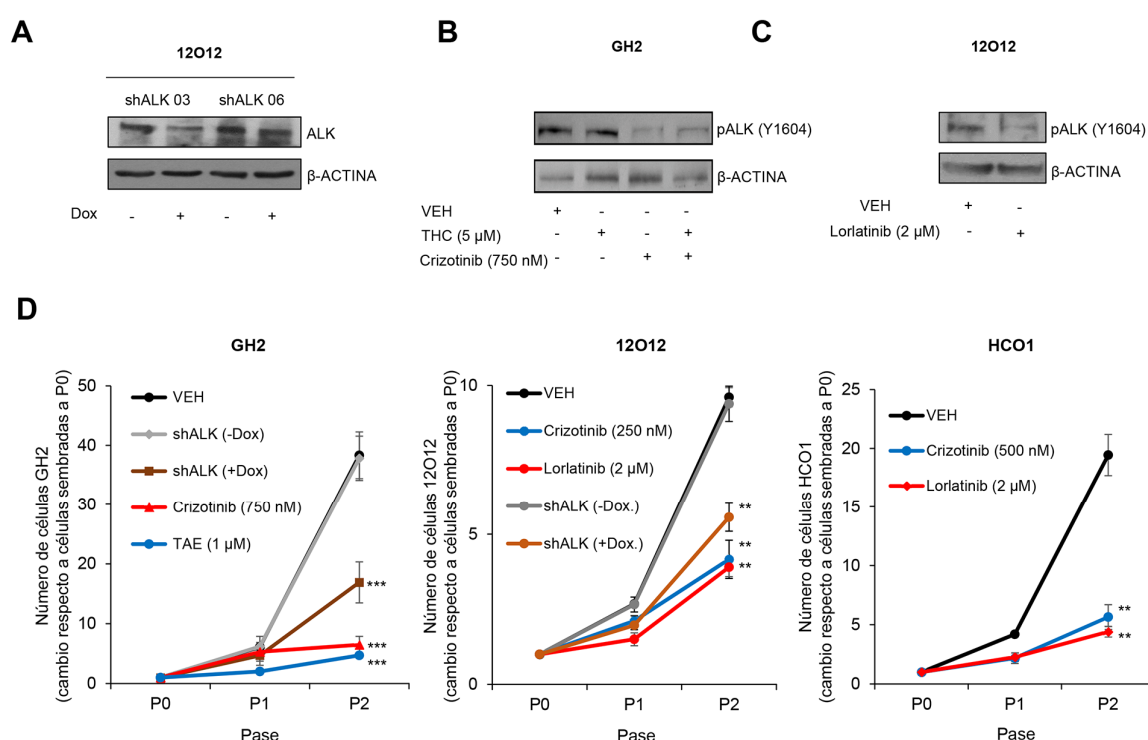


Figura R15. La inhibición genética o farmacológica de ALK reduce el crecimiento de distintos cultivos de GICs

(A) Niveles proteicos de ALK (determinados mediante Western blot) tras el silenciamiento de este receptor inducido por el tratamiento con doxiciclina (+Dox) de células 12O12 transducidas de manera estable con 2 *shALK* distintos (n=3). **(B)** Efecto del tratamiento con crizotinib (750 nM, 1h.) en los niveles de fosforilación de ALK de células GH2. **(C)** Efecto del tratamiento con lorlatinib (2 μ M, 6h.) en los niveles de fosforilación de ALK de células 12O12. **(D)** Efecto de la inhibición genética (tras el tratamiento con doxiciclina (+Dox) de células GH2 y 12O12 transducidas de manera estable con un *shALK* inducible) o farmacológica (tras la incubación de células GH2, 12O12 y HCO1 con TAE, crizotinib o lorlatinib) sobre el número total de células presentes en estos cultivos durante 2 pases consecutivos (n=3). **P < 0,01; ***P < 0,001 respecto a *shALK* (-Dox) o VEH.

De forma similar a los resultados obtenidos tras la inhibición de MDK, el bloqueo genético o farmacológico de ALK disminuyó significativamente tanto el número total de células (**Figura R15D**), como la capacidad de auto-renovación de distintos cultivos de GICs (**Figura R16A-C**).

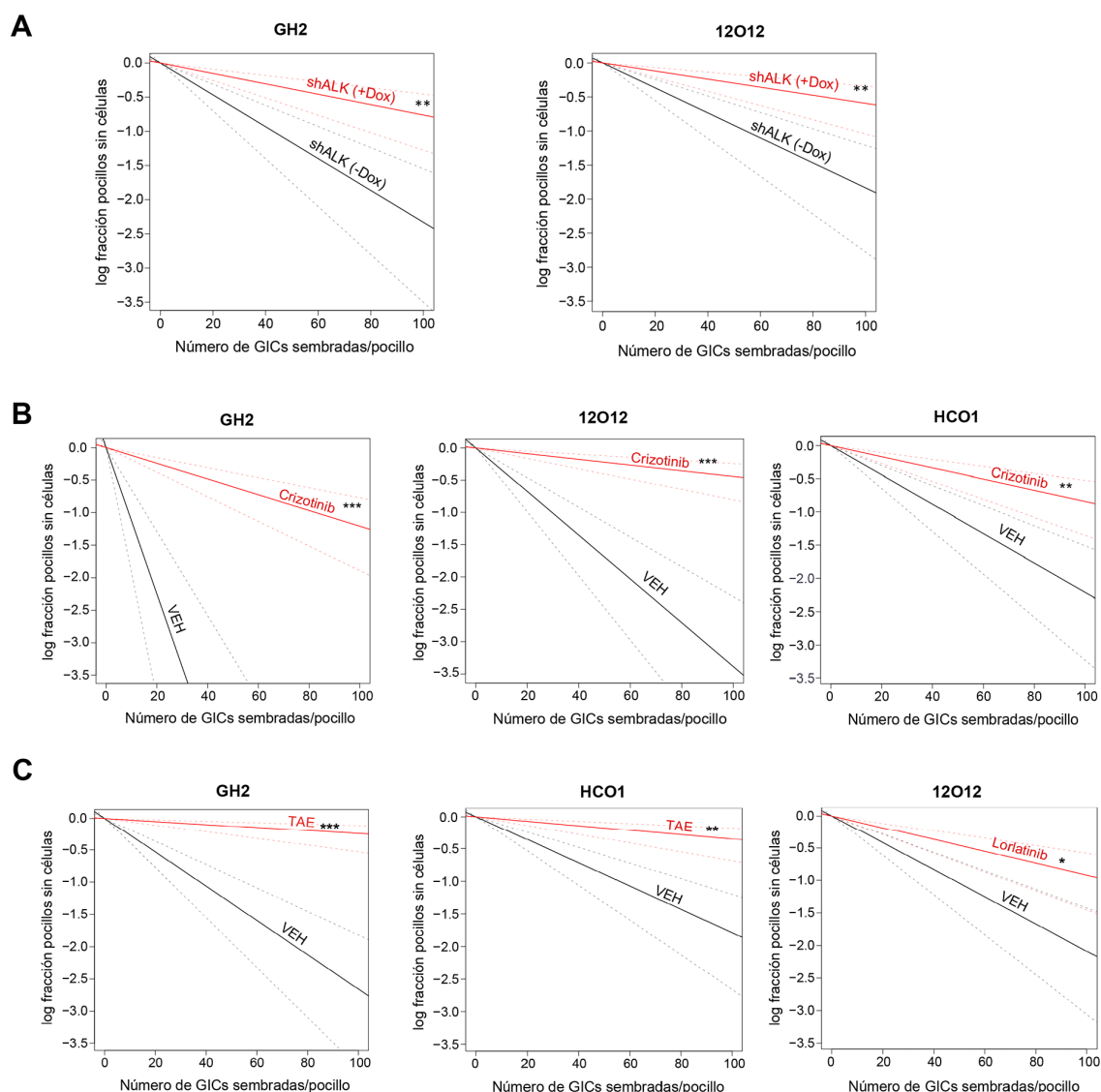


Figura R16. La inhibición genética o farmacológica de ALK reduce la capacidad de auto-renovación de distintos cultivos de GICs

(A) Efecto del silenciamiento de ALK (tras el tratamiento con doxiciclina (+Dox) en la capacidad de auto-renovación (determinada mediante ensayos de LDA) de células GH2 y 12012 transducidas de manera estable con un *shALK* inducible). Se muestra un experimento representativo de $n=2$. $**P < 0,01$ respecto a *shALK* (-Dox). **(B-C)** Efecto del tratamiento durante 5 días con crizotinib (750 nM, **panel B**), TAE (750 nM, **panel C**), o lorlatinib (1 μ M, **panel C**) en la capacidad de auto-renovación (determinada mediante ensayos de LDA) de células GH2, 12012 o HCO1. Se muestra un experimento representativo ($n=2$). $*P < 0,05$; $**P < 0,01$; $***P < 0,001$ respecto al VEH.

Estas observaciones son consistentes con la reducción observada en los niveles de expresión de distintos marcadores de células progenitoras neurales, medidos mediante qPCR, tras el bloqueo genético o farmacológico de ALK (**Figura R17A-C**). Específicamente, el tratamiento de células HCO1 con el inhibidor TAE disminuyó significativamente el número de células NESTINA positivas cuantificadas en experimentos de inmunofluorescencia (**Figura R17D**). Asimismo, la incubación con TAE y crizotinib redujo de una forma notable los niveles proteicos tanto de NESTINA como de MSI1 en células GH2 (**Figura R17E**).

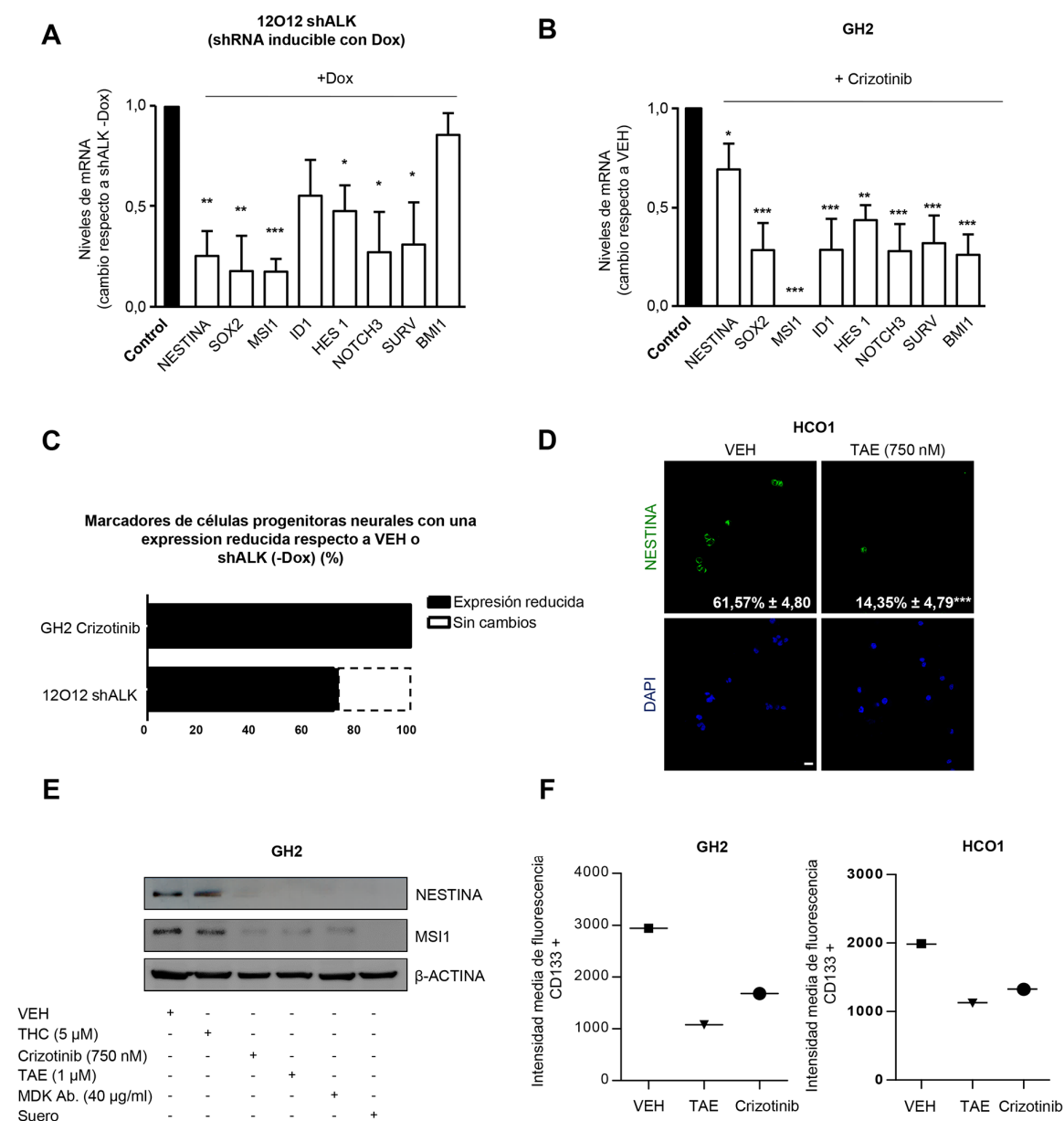


Figura R17. La inhibición genética o farmacológica de ALK reduce los niveles de expresión de marcadores de células progenitoras

(A-B) Efecto del silenciamiento de ALK (tras el tratamiento con doxíciclina, +Dox, **panel A**) o del tratamiento con crizotinib (750 nM, 72h., **panel B**) en los niveles de mRNA (determinados mediante qPCR) de un panel de marcadores característicos de células progenitoras neurales en células 12012 *shALK* y en células GH2 respectivamente. Los datos se expresan como el cambio en los niveles de mRNA en cada gen (media ± SEM) respecto a las células *shALK* (-Dox) o VEH. *P < 0,05; **P < 0,01 y ***P < 0,001. **(C)** Porcentaje de marcadores de células progenitoras neurales regulados a la baja después de la inhibición genética o farmacológica de ALK en cultivos GH2 y 12012. **(D)** Efecto del tratamiento con TAE (750 nM, 72h) en la expresión de NESTINA (evaluada mediante inmunofluorescencia) de células HCO1. Los valores mostrados en cada imagen corresponden al porcentaje de células NESTINA positivas en relación con el número total de núcleos. Se muestra una imagen representativa de cada condición experimental. *** P < 0,001 de células tratadas con VEH. Barra de escala: 20 μm. **(E)** Efecto del tratamiento con MDK Ab. (40 μg/ml), TAE (750 nM) y crizotinib (1 μM) durante 72 horas sobre los niveles proteicos de NESTINA y MUSASHI-1 (MSI1) en células GH2. Se muestra un Western blot representativo (n=2). **(F)** Efecto del tratamiento con TAE (750 nM) y crizotinib (1 μM) durante 72 horas sobre los niveles de CD133 cuantificados mediante citometría de flujo (intensidad media de fluorescencia). Se muestra un experimento representativo.

RESULTADOS

Además, los niveles de la proteína de membrana CD133, un marcador habitualmente sobre-expresado en GICs (Singh et al. 2004), se vieron claramente reducidos en células GH2 y HCO1 tras el tratamiento con TAE y crizotinib (**Figura R17F**).

Por último, evaluamos si el receptor ALK participa en la capacidad de estas células para generar tumores ortotópicos en ratones inmunodeficientes. Con esta finalidad, inyectamos células 12012 infectadas con partículas lentivirales que expresan un *shRNA* frente a ALK inducible por doxiciclina siguiendo el mismo protocolo llevado a cabo previamente (**Figura R18A**). Como se muestra en la **Figuras 18B y 18C**, el silenciamiento de ALK inducido por doxiciclina inhibió el crecimiento de los tumores generados y aumentó significativamente la supervivencia de estos ratones de una forma similar a la que lo hizo el silenciamiento de MDK.

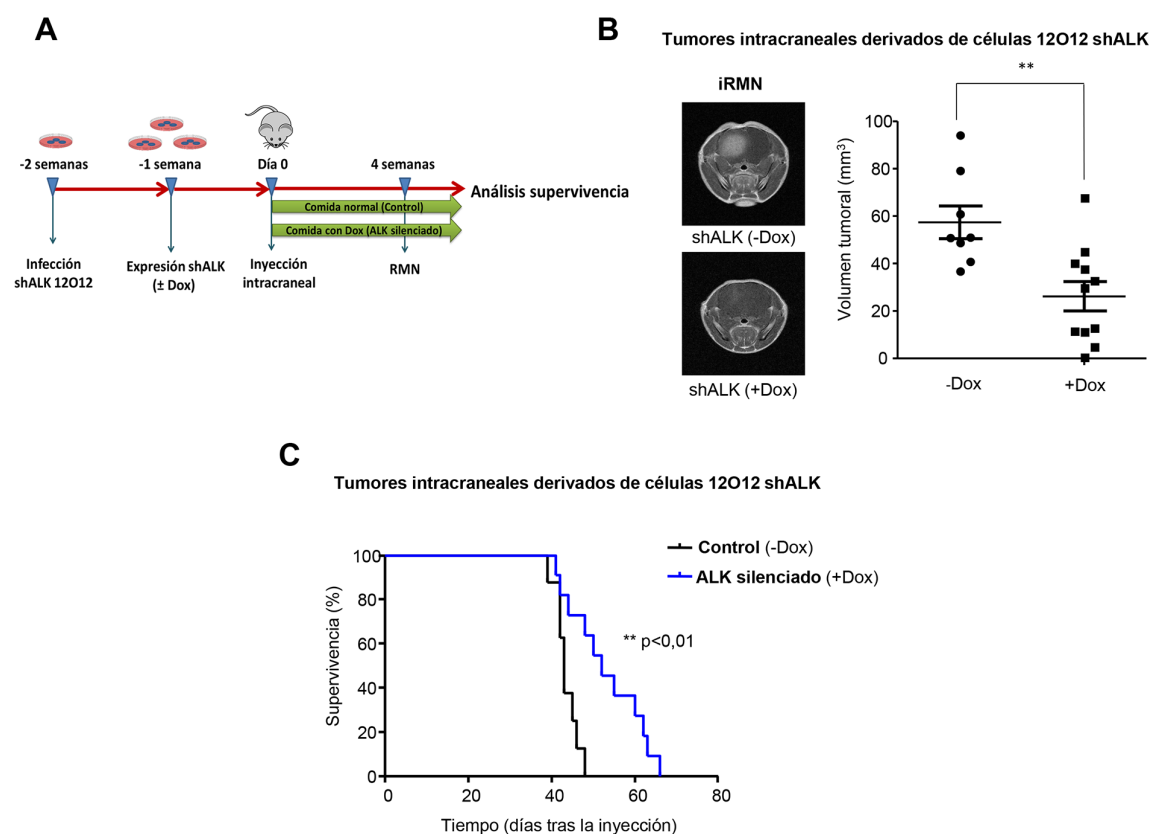


Figura R18. El silenciamiento genético de ALK retrasa el crecimiento de tumores intracraneales generados con GICs e incrementa la supervivencia de los ratones que portan estos tumores

(A) Esquema del procedimiento para generar tumores intracraneales mediante la inyección de $7,5 \times 10^4$ células 12012 transducidas de manera estable con un *shALK* inducible en el estriado de ratones inmunodeficientes. **(B)** Efecto de la inhibición genética de ALK sobre el tamaño de tumores intracraneales (determinado mediante imagen de RMN, iRMN) (n=8-11 animales por condición experimental). **Panel izquierdo:** Imágenes representativas de RMN 4 semanas después de la inyección. **Panel derecho:** Representación gráfica del volumen tumoral (mm³) 4 semanas después de la inyección. Media ± SEM. * P < 0,05 respecto a 12012 *shALK* (-Dox). **(C)** Efecto de la inhibición genética de ALK en la supervivencia de los ratones que portan estos tumores. Los datos se representan en una gráfica de Kaplan-Meier. (n=12). **P < 0,01 respecto los ratones inyectados con células 12012 *shALK* (-Dox).

En conjunto, estos hallazgos apoyan firmemente la idea de que el eje MDK/ALK desempeña un papel relevante en el mantenimiento de las propiedades *stem-like* y en la capacidad tumorigénica de las GICs.

- Objetivo 3: Análisis del mecanismo de acción del eje MDK/ALK en GICs

3.1 La regulación del factor de transcripción SOX9 es una etapa clave para la pérdida de las características *stem-like* inducida por el bloqueo del eje MDK/ALK

A continuación, nos propusimos estudiar con más detalle los mecanismos celulares y moleculares subyacentes a la acción ejercida por el bloqueo del eje MDK sobre las propiedades *stem-like* de nuestros cultivos de GICs. Como se detalla en el apartado de Introducción de esta tesis, la señalización mediada por diversos factores de crecimiento que favorecen el mantenimiento de las propiedades *stem-like* de GICs converge en la activación de distintos factores de transcripción. Estos factores de transcripción estimulan la expresión de otros genes o marcadores que promueven la capacidad de auto-renovación y la tumorigénesis de estas células (Dietrich et al., 2010; Zhang S et al., 2012). Entre esos factores de transcripción se encuentra la familia de proteínas SOX, que desempeña un papel crucial en el control de la progresión tumoral y en el mantenimiento del fenotipo *stem-like* de las GICs (Gangemi et al., 2009; Ikushima et al., 2009; Hiraoka et al., 2015). Por ese motivo, nos planteamos si la modulación del eje MDK/ALK podría estar regulando estos factores de transcripción.

Como se muestra en la **Figura R19A**, la inhibición genética del eje MDK/ALK en cultivos de GICs promovió una disminución significativa y sostenida a largo plazo en los niveles de expresión de SOX2, SOX4 y SOX9 [miembros de la familia SOX a los que se les ha atribuido una función pro-tumorigénica (Matheu et al., 2012)], en línea con la caída en los niveles de mRNA observada en otros marcadores característicos de células progenitoras. No obstante, el análisis de los niveles proteicos de SOXs en células GH2 a tiempos más cortos (24 horas) mediante la incubación con un anticuerpo neutralizante de MDK o con el inhibidor de ALK TAE, mostró una reducción significativa de SOX9, pero no de SOX2, SOX4 o de otros marcadores de células progenitoras como CD133 (**Figura R19B**).

Estas observaciones nos llevaron a hipotetizar que esta regulación temprana de los niveles proteicos de SOX9 podría ser un evento clave para la pérdida de las propiedades *stem-like* de las GICs tras el bloqueo del eje MDK/ALK. Así, comprobamos que el silenciamiento de SOX9 inhibió de forma significativa la capacidad de auto-renovación de distintos cultivos de GICs en ensayos de LDA (**Figura R20A**) y redujo los niveles de expresión de distintos marcadores de células progenitoras en estos cultivos (**Figura R20B**), reproduciendo así el efecto ejercido por la inhibición del eje MDK/ALK. Por el contrario, la re-expresión de una forma murina de SOX9 (**Figura R21A**) previno el efecto inhibitorio inducido por el bloqueo genético (**Figura R21B**) o farmacológico (**Figura R21C**) de MDK sobre la capacidad de auto-renovación de células GH2. Del mismo modo, el descenso en los niveles de mRNA de distintos marcadores característicos de células progenitoras observado tras la incubación de estos

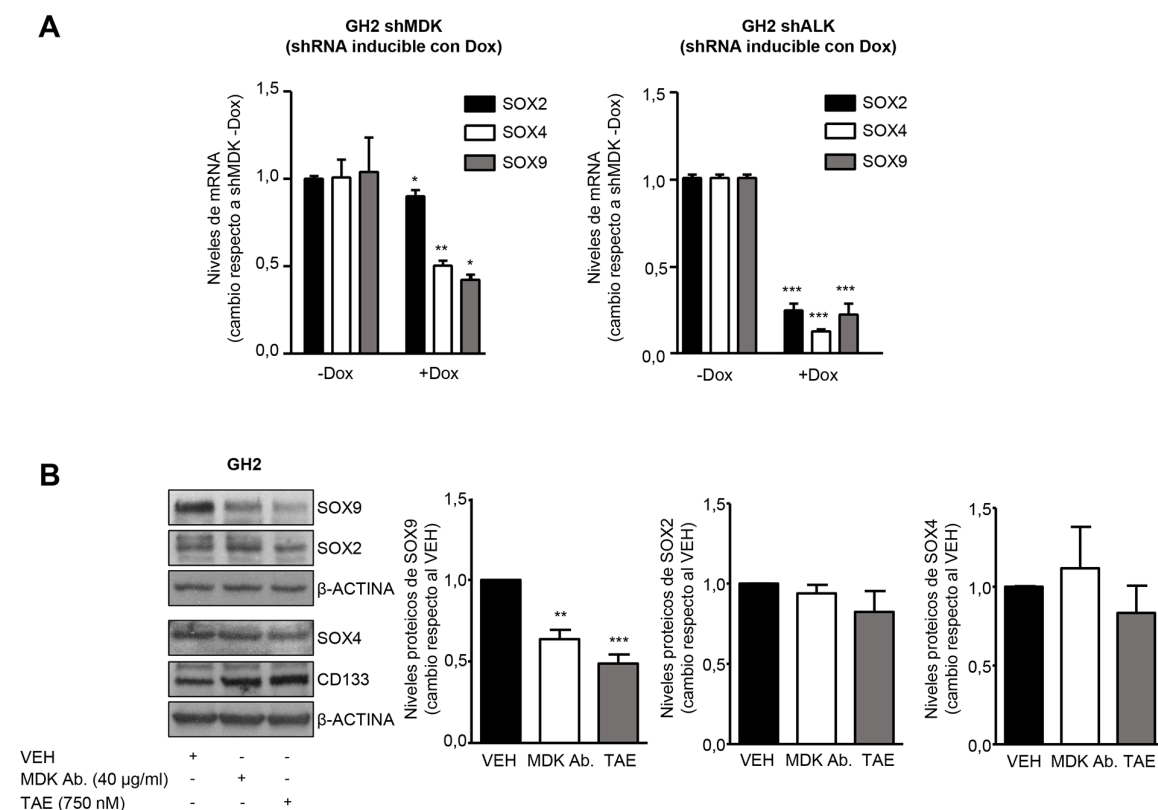


Figura R19. El bloqueo del eje MDK/ALK reduce los niveles de expresión de SOX9

(A) Efecto del tratamiento con doxiciclina (+Dox) en los niveles de mRNA (determinados mediante qPCR) de *SOX2*, *SOX4* y *SOX9* en células GH2 transducidas de manera estable con un *shMDK* (panel izquierdo) o un *shALK* (panel derecho) inducible. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ respecto a las células *shMDK* (-Dox); *** $P < 0,001$ respecto a las células *shALK* (-Dox). **(B)** Efecto de la incubación con un anticuerpo neutralizante de MDK (MDK Ab. 40 µg/ml) o TAE (750 nM) durante 24 horas en los niveles proteicos (evaluados mediante Western blot) de *SOX2*, *SOX4*, *SOX9* y CD133 en células GH2. **Panel izquierdo:** se muestra un Western blot representativo (n=3-5). **Panel derecho:** análisis densitométrico de los niveles de *SOX9*, *SOX2* y *SOX4*. Los datos se muestran como la relación entre los niveles del correspondiente SOX y los niveles de proteína utilizados como control de carga (β -ACTINA) para cada condición experimental relativa al VEH (media \pm SEM; n = 5). ** $P < 0,01$ y *** $P < 0,001$.

cultivos con un anticuerpo neutralizante de MDK fue revertido, al menos parcialmente, por la sobre-expresión de *SOX9* (**Figura R21D**). Estos estudios, muestran por tanto que el restablecimiento de los niveles de *SOX9* revierte los efectos del silenciamiento de MDK sobre la capacidad de proliferación y auto-renovación de GICs, indicando que *SOX9* es un efector de la MDK y que el eje MDK/ALK regula las características *stem-like* de las GICs mediante el control de los niveles de *SOX9*.

3.2 El descenso en los niveles de *SOX9* tras el bloqueo del eje MDK/ALK no es dependiente de mecanismos transcripcionales o degradación proteasomal

Debido a la variedad de funciones que ejercen en la célula, los miembros de la familia SOX se encuentran sometidos a un amplio rango de mecanismos regulatorios. Así por ejemplo los niveles de *SOX9* pueden ser regulados tanto a nivel transcripcional (Cai et al., 2013) como

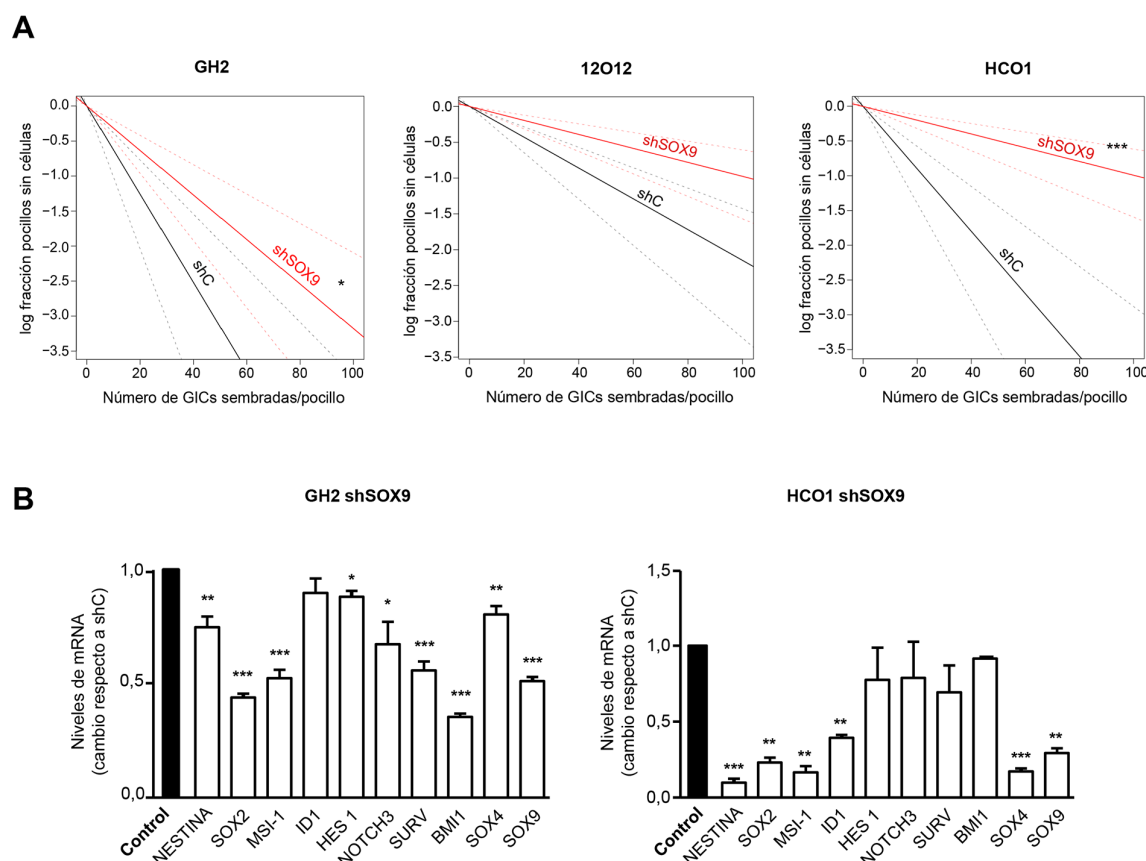


Figura R20. El silenciamiento de SOX9 inhibe la capacidad de auto-renovación de las GICs

(A) Efecto de la nucleofección con un plásmido pLKO que codifica un *shRNA* control (*shC*) o un *shRNA* selectivo de SOX9 (*shSOX9*) sobre la capacidad de auto-renovación (determinada mediante LDA) de células GH2, 12012 y HCO1. Se muestra un experimento representativo (n=2). *P < 0,05; ***P < 0,001 respecto a las células *shC*. **(B)** Efecto de la nucleofección con el plásmido pLKO *shC* o *shSOX9* (72 h.) en los niveles de mRNA (determinados mediante qPCR) de un panel de marcadores de células progenitoras neurales en cultivos GH2 (**panel izquierdo**) o HCO1 (**panel derecho**). Los datos se expresan como el cambio en los niveles de mRNA en cada gen (media \pm SEM) respecto a células nucleofectadas con el plásmido pLKO *shC* (control). *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001.

post-traduccional, a través de su ubiquitinación y posterior degradación en el proteasoma (Suryo Rahmanto et al., 2016). Teniendo en cuenta estos datos, en primer lugar analizamos si la disminución en los niveles de SOX9 observada tras el bloqueo del eje MDK/ALK estaba mediada por alguno de estos mecanismos. Sin embargo, los niveles de mRNA de SOX9 no se modificaron tras la incubación de células GH2 con un anticuerpo neutralizante de MDK o con el inhibidor de ALK TAE durante 24 horas, indicando que SOX9 no se encuentra regulado a nivel transcripcional en este contexto (**Figura R22A**). Igualmente, la incubación de estas células con lactacistina, un inhibidor del proteasoma, fue incapaz de prevenir el descenso en los niveles proteicos de SOX9 promovido por el bloqueo farmacológico de MDK o ALK (**Figura R22B**), demostrando que no se está degradando mediante este mecanismo. Por lo tanto, estos resultados sugieren que la regulación ejercida por la inhibición del eje MDK/ALK sobre SOX9 es dependiente de la activación de otros mecanismos de señalización intracelulares.

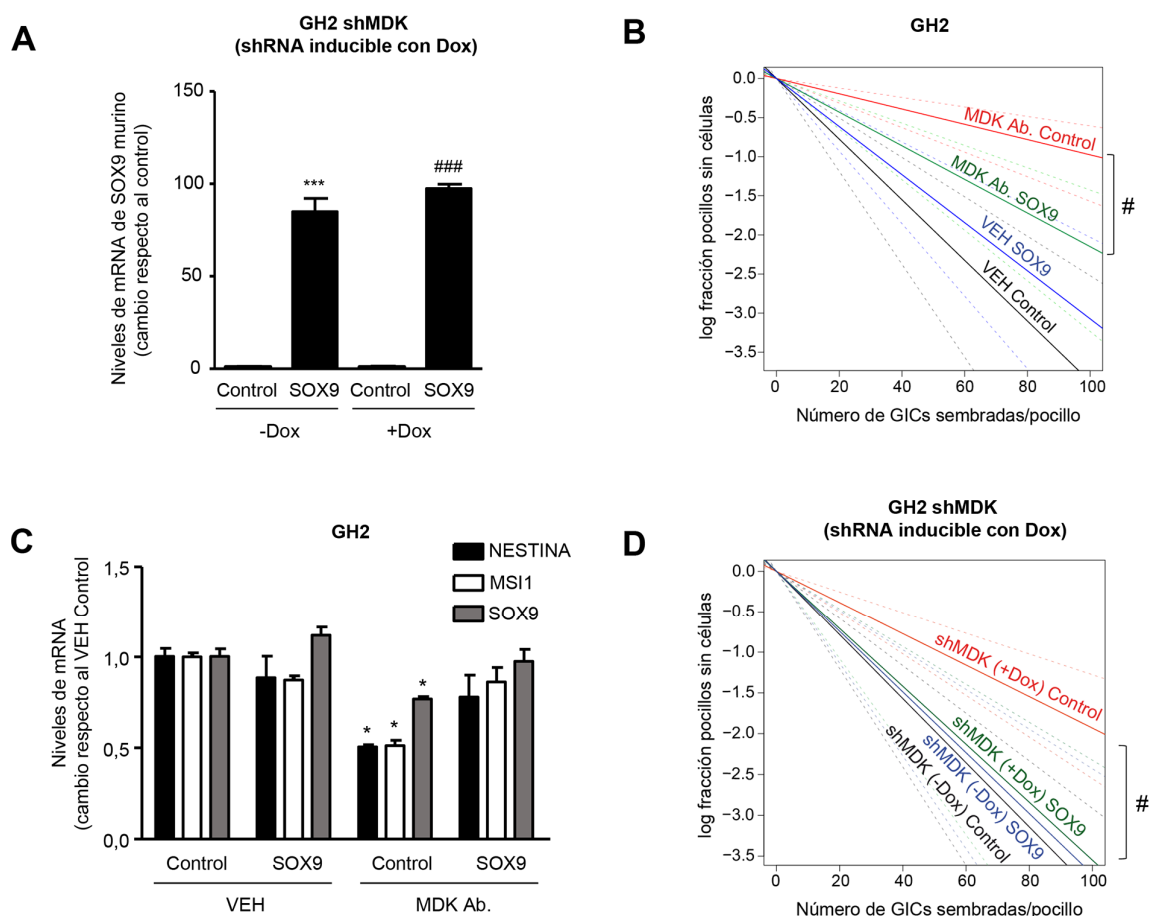


Figura R21. La sobre-expresión de SOX9 revierte el efecto inhibitorio ejercido por el bloqueo de MDK sobre las GICs

(A) Efecto de la nucleofección con un plásmido control (pWPXL-GFP, Control) o un plásmido que codifica un SOX9 murino (pWPXL-SOX9, SOX9) sobre los niveles de mRNA (determinados mediante qPCR) de *Sox9* murino en células GH2 transducidas con un *shMDK* inducible con doxiciclina (Dox). Los datos se expresan como el cambio en los niveles de mRNA (media \pm SEM) respecto a células *shMDK* (-Dox) nucleofectadas con el plásmido pWPXL. ***P < 0,001 respecto a células control *shMDK* (-Dox); ### P < 0,001 respecto a células control *shMDK* (+Dox).

(B-C) Efecto de la incubación con un anticuerpo neutralizante de MDK (MDK Ab. 40 μ g/ml, 72h.) y nucleofección con un plásmido control (Control) o un plásmido que codifica un SOX9 murino (SOX9) en la capacidad de auto-renovación (determinada mediante LDA, n=2, **panel B**) o en los niveles de mRNA (determinados mediante qPCR, n=3, **panel C**) de *NESTIN*, *MSI1* y *SOX9* en células GH2. #P < 0,05 respecto a células nucleofectadas con el plásmido control. * P < 0,05 respecto a células VEH. **(D)** Efecto de la inhibición genética de MDK (tras el tratamiento con doxiciclina, +Dox) y de la nucleofección con un plásmido control u otro que permite la expresión de SOX9 en la capacidad de auto-renovación (determinada mediante LDA) de células GH2 *shMDK* (n=2). #P < 0,05 respecto a las células *shMDK* (+Dox) Control. El resto del análisis estadístico correspondiente a los ensayos de LDA se omite por claridad y se muestra en el Anexo I.

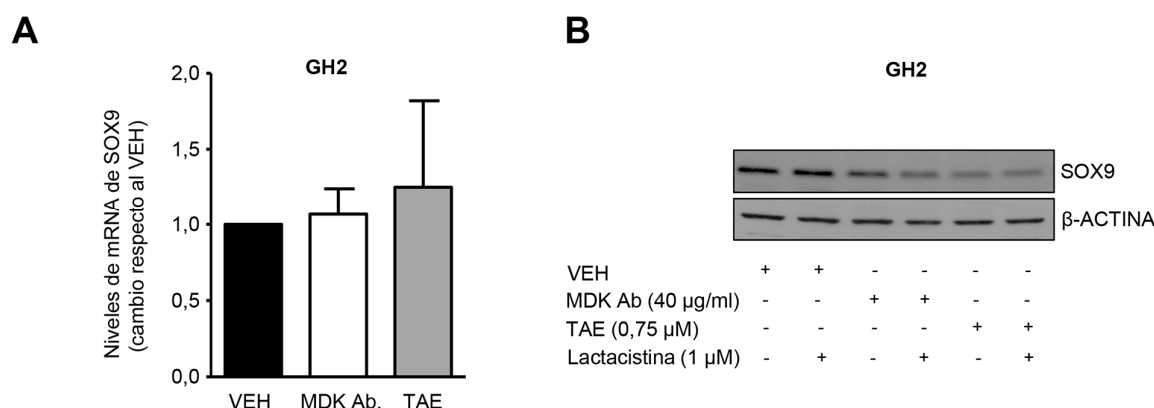


Figura R22. El bloqueo del eje MDK/ALK promueve la degradación de SOX9 de forma independiente del proteasoma o de cambios en los niveles de su mRNA

(A) Efecto de la incubación con un anticuerpo neutralizante de MDK (MDK Ab; 40 μ g/ml) y TAE (0,75 μ M) durante 24 h. en los niveles de mRNA de *SOX9* determinados mediante qPCR. Media \pm SEM respecto a células VEH (n=3). **(B)** Efecto de la incubación con un anticuerpo neutralizante de MDK (MDK Ab; 40 μ g/ml) y TAE (0,75 μ M) durante 24 h. en los niveles de proteína de *SOX9* (determinados mediante Western blot) de células GH2 no tratadas o pretratadas con lactacistina (1 μ M) durante 1 hora (n=3).

3.3 El bloqueo del eje MDK/ALK activa la autofagia en GICs

Una de las principales rutas de señalización acopladas a la activación del receptor ALK es la vía AKT/mTORC1 (Ardini et al., 2010). Por este motivo, estudiamos si el bloqueo de la señalización dependiente de MDK podría afectar a la actividad de esta ruta. Datos no publicados de nuestro grupo de investigación muestran que la neutralización de MDK en células GH2 conlleva una clara inhibición del eje AKT/MTORC1. Uno de los procesos más importantes que se encuentra regulado por este eje es la autofagia, un mecanismo celular responsable de la degradación y reciclaje de proteínas y otros componentes celulares, cuya activación se ha relacionado con la regulación de la biología de células iniciadoras de tumores (Vitale, et al., 2015). Dado que la inhibición del eje MDK/ALK conlleva una inhibición de MTORC1 en nuestros cultivos de GICs, quisimos estudiar si el bloqueo de este eje podría estimular también la autofagia.

De acuerdo con esta hipótesis, la incubación de células GH2 durante 24 horas con un anticuerpo neutralizante de MDK o con los inhibidores de la actividad tirosina-quinasa de ALK TAE y crizotinib, promovió un aumento significativo en los niveles de la forma lipídada de LC3, LC3-II, un marcador de activación autofágica (Kabeya et al., 2000)(Figura R23A). Además, la incubación previa de estas células con los inhibidores de las proteasas lisosomales E64d y pepstatina A (capaces de bloquear la acción de las proteasas lisosomales y por tanto la última etapa de degradación de la vía autofagosoma-lisosoma), incrementó de forma más pronunciada los niveles de LC3-II (Figura R23A), confirmando así que el bloqueo del eje MDK/ALK lleva a la activación de una autofagia dinámica en GICs.

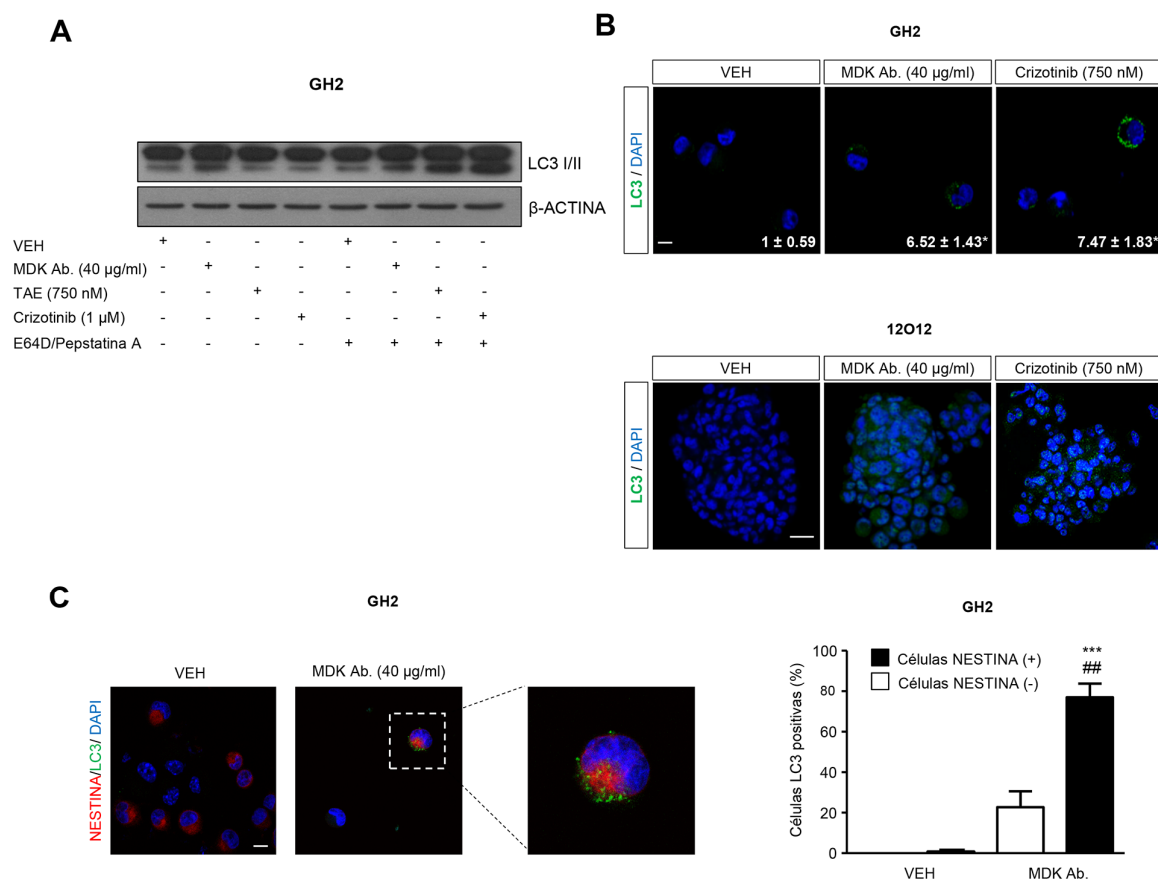


Figura R23. La inhibición del eje MDK/ALK induce autofagia en GICs

(A) Efecto de la incubación con MDK Ab. (40 µg/ml), TAE (750 nM) y crizotinib (1 µM) durante 24 horas en la autofagia (medida como la lipidación de LC3) de células GH2 no tratadas o pretratadas durante 1 hora con E64d (10 µM) y pepstatina A (10 µg/ml). Se muestra un Western blot representativo (n=3). **(B)** Efecto de la incubación con MDK Ab. (40 µg/ml) y crizotinib (750 nM) durante 24 horas sobre la inmunofluorescencia de LC3 en células GH2 (**panel superior**) y 12012 (**panel inferior**). Los valores en la esquina inferior derecha de cada imagen superior corresponden a la relación entre la suma del área total de las vesículas de LC3 y el área total de la célula. Se muestran imágenes representativas (n=3). *P < 0,05 respecto al VEH. **(C)** Efecto de la incubación con MDK Ab. (40 µg/ml, 24h.) en los niveles de NESTINA y LC3 (determinados mediante inmunofluorescencia) de células GH2. **Panel izquierdo:** imágenes representativas de cada condición experimental (n=3). **Panel derecho:** cuantificación del número de células GH2 con marcaje LC3 positivo dentro de la población de células NESTINA positivas o negativas en cada condición experimental. *** P < 0,001 respecto a células VEH NESTINA positivas; ## P < 0,01 respecto a células tratadas con MDK Ab. NESTINA negativas.

Asimismo, observamos una marcada acumulación de la proteína LC3 (en forma de puntos o *dots* característicos de la activación de la autofagia) en el citoplasma de células GH2 y 12012 tras el tratamiento con el anticuerpo anti-MDK o con crizotinib (**Figura R23B**). Estos resultados demuestran que la inhibición del eje MDK/ALK estimula la autofagia en distintos cultivos de GICs.

3.4 La estimulación de la autofagia es necesaria para la pérdida de las propiedades *stem-like* inducida por el bloqueo del eje MDK/ALK

Una de las ventajas que presenta la utilización de cultivos de GICs es que reproducen de forma más precisa que los cultivos de líneas celulares la heterogeneidad característica del GBM. Así, en ellos podemos encontrar células con distinto grado de diferenciación y que por tanto expresan niveles diferentes de marcadores de células progenitoras neurales. Por este motivo, nos planteamos si la estimulación de la autofagia observada tras el bloqueo de la señalización por MDK afectaba por igual a todas las poblaciones celulares presentes en el cultivo o bien ocurría de forma selectiva en aquellas poblaciones que mostraban un fenotipo *stem-like*. En línea con esta última hipótesis, la acumulación de LC3 tras la incubación de células GH2 con un anticuerpo neutralizante de MDK durante 24 horas tuvo lugar preferentemente en aquellas células que expresaban NESTINA (**Figura R23C**). Aunque estos datos no implican que otras células dentro del cultivo con un mayor grado de diferenciación no puedan también sufrir autofagia en respuesta al bloqueo del eje MDK/ALK, o que puedan sufrirla a otros tiempos, sí sugieren que la inducción temprana de autofagia y la pérdida del fenotipo *stem-like* inducidas por la inhibición del eje MDK/ALK están relacionadas.

Para analizar la relevancia de esta estimulación de la autofagia en la pérdida de las propiedades *stem-like*, analizamos el efecto de la inhibición de la señalización por MDK en cultivos de GICs que expresan un *shRNA* inducible por doxíciclina dirigido frente a un gen esencial de autofagia como *ATG5* (**Figura R24A**). Como se muestra en la **Figura R24B**, el tratamiento con un anticuerpo neutralizante de MDK promovió una inducción temprana (24h) y transitoria de autofagia acompañada de una reducción progresiva y sostenida de los niveles proteicos de los marcadores de células progenitoras neurales MUSASHI-1 (MSI1) y CD133 en células GH2 en las que la autofagia se encontraba intacta, pero no en células en las que *ATG5* se encontraba silenciado. Además, la inhibición genética de la autofagia [mediante la transducción de células GH2 con el *shATG5* inducible por doxíciclina descrito anteriormente (**Figura R24C**) o con un *shRNA* constitutivo frente a otro gen esencial de autofagia como *ATG7* (**Figura R24D**)] revirtió el efecto ejercido por la incubación con un anticuerpo neutralizante de MDK o por la inhibición farmacológica de ALK sobre la capacidad de auto-renovación de estas células.

En conjunto, estos resultados apoyan firmemente la idea de que la estimulación de la autofagia es necesaria para la pérdida de las propiedades *stem-like* inducida por el bloqueo del eje MDK/ALK en GICs.

3.5 La inhibición del eje MDK/ALK induce la degradación autofágica de SOX9 en GICs

Teniendo en cuenta que la activación de la autofagia y el descenso de los niveles proteicos de SOX9 inducidos por la inhibición del eje MDK/ALK son eventos que coinciden en el tiempo, nos preguntamos si este mecanismo celular puede ser responsable de la degradación de SOX9 y la subsiguiente inhibición de las propiedades *stem-like* de las GICs.

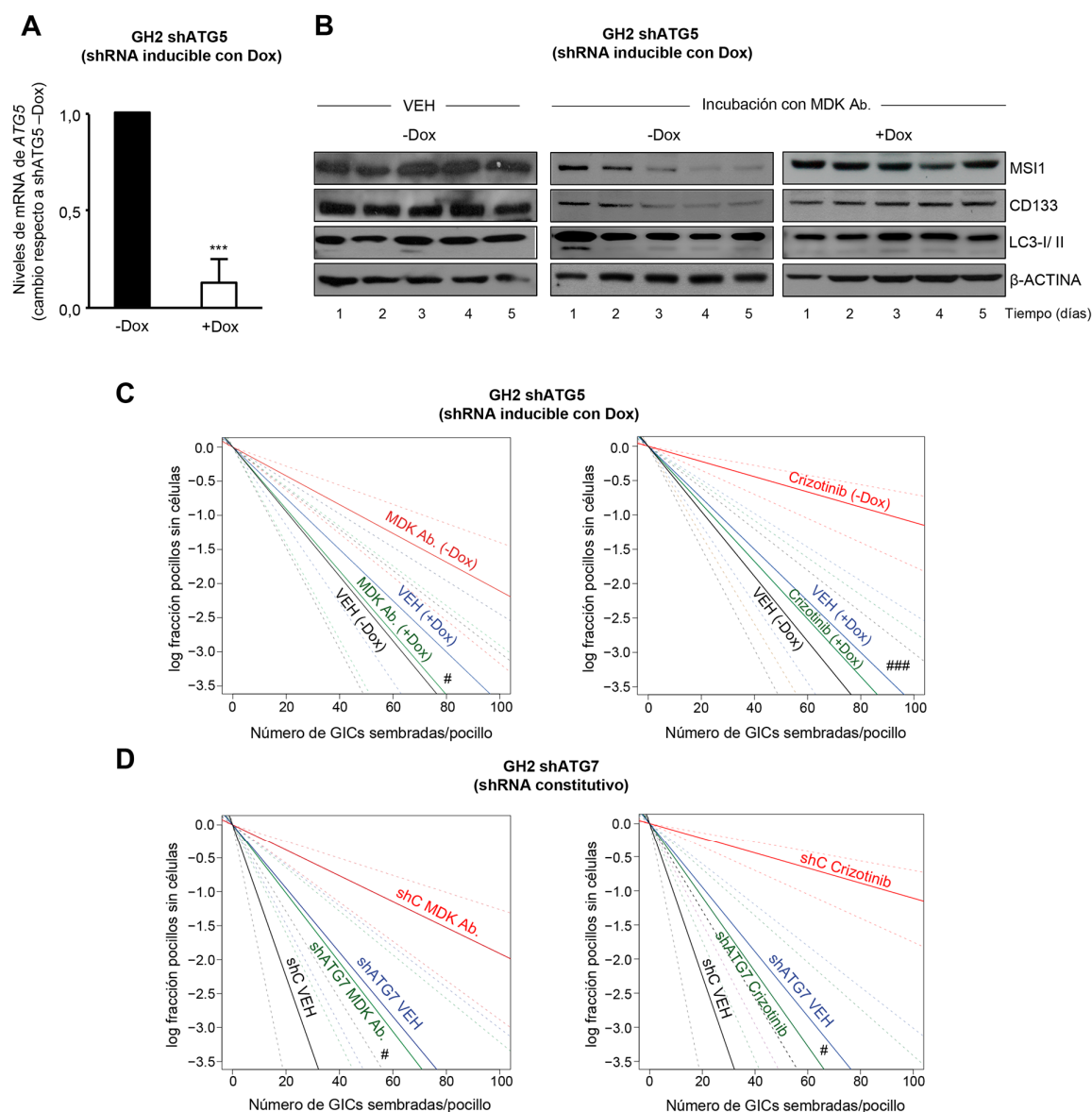


Figura R24. La estimulación de la autofagia es necesaria para la pérdida de las propiedades *stem-like* de las GICs inducida por la inhibición del eje MDK/ALK

(A) Efecto de la inhibición genética de ATG5 [inducida mediante el tratamiento con doxiciclina (+Dox.)] en los niveles de mRNA de este gen (determinados mediante qPCR) en células GH2 transducidas de forma estable con un *shATG5* inducible (*shATG5*). Los datos se expresan como el cambio en los niveles de mRNA de ATG5 (media \pm SEM) respecto a *shATG5* (-Dox). VEH. *** $P < 0,001$. **(B)** Efecto de la incubación con un anticuerpo neutralizante de MDK (MDK Ab. 40 μ g/ml) en los niveles proteicos de MUSASHI1 (MS1), CD133 y LC3-I/II de células GH2 *shATG5* tratadas o no tratadas con doxiciclina (Dox). Se muestra un experimento representativo de Western blot ($n=2$).

(C) Efecto de la incubación con MDK Ab. (40 μ g/ml, **panel izquierdo**) o crizotinib (750 nM, **panel derecho**) sobre la capacidad de autorrenovación (determinada mediante LDA) de células GH2 *shATG5* tratadas o no tratadas con doxiciclina (Dox). Se muestra un experimento representativo ($n=2$). # $P < 0,05$; ### $P < 0,001$ respecto a las células *shATG5* (-Dox). **(D)** Efecto de la incubación con MDK Ab. (40 μ g/ml, **panel izquierdo**) o crizotinib (750 nM, **panel derecho**) sobre la capacidad de autorrenovación (determinada mediante LDA) de células GH2 transducidas de forma estable con un sh control (*shC*) o un *shATG7* constitutivo (*shATG7*). Se muestra un experimento representativo ($n=2$). # $P < 0,05$; ### $P < 0,001$ respecto a las células *shC*. El resto del análisis estadístico correspondiente a los ensayos de LDA se omite por claridad y se muestra en el Anexo I.

A diferencia de los datos obtenidos con el inhibidor del proteasoma, la inhibición farmacológica de las proteasas lisosomales (y, por lo tanto, de la degradación de proteínas a

través de la vía autofagosoma-lisosoma) mediante el uso de E64d + pepstatina A, previno la disminución de los niveles proteicos de SOX9 tras el tratamiento con el anticuerpo neutralizante de MDK (**Figura R25A**) o con TAE (**Figura R25B**). Una reversión similar de la caída de los niveles de SOX9 se observó tras la inhibición genética de la autofagia en células GH2 en las que *ATG5* (**Figura R25 A-B**) o *ATG7* (**Figura R26A**) se encontraban silenciados de forma constitutiva. Los controles del silenciamiento de ambos genes se muestran en las **Figuras R26B-C**.

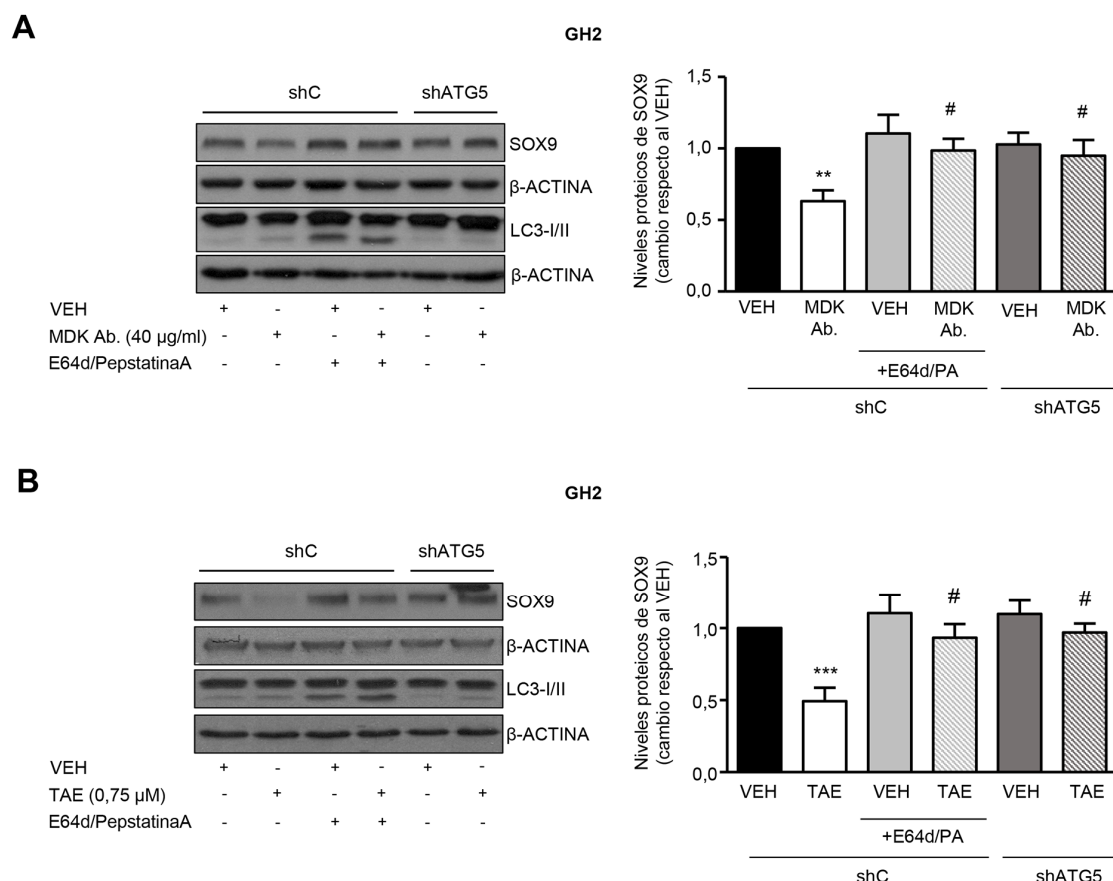


Figura R25. El bloqueo del eje MDK/ALK en GICs induce la degradación autofágica de SOX9

(A-B) Efecto de la incubación con el anticuerpo neutralizante de MDK (MDK Ab.; 40 µg/ml; 24h, **panel A**) y TAE (750 nM, 24h., **panel B**) sobre los niveles proteicos de SOX9 y LC3-I/II en células GH2 transducidas de forma estable con un *shRNA* control (*shC*) o un *shRNA* selectivo para *ATG5* (*shATG5*) de expresión constitutiva. Donde se indica, las células fueron pretratadas con E64d (10 µM) y pepstatina A (PA, 10 µg/ml) durante 1 hora. **Panel izquierdo:** se muestra un Western blot representativo (n=5). **Panel derecho:** análisis densitométrico de los niveles de SOX9. Los datos se muestran como la relación entre los niveles de SOX9 y los niveles de proteína utilizados como control de carga (β-ACTINA) para cada condición experimental relativa al VEH (media ± SEM; n = 5). ** P < 0,01 respecto a las células *shC* VEH; # P < 0,05 respecto a las células MDK Ab./TAE *shC*.

Aunque se ha propuesto que la selección y posterior degradación de proteínas y orgánulos a través de la vía autofagosoma-lisosoma implica su incorporación inespecífica al autofagosoma, al menos una parte de estas proteínas puede ser dirigida selectivamente mediante su interacción con LC3 u otras proteínas implicadas en la formación del fagóforo (Zaffagnini & Martens, 2016).

RESULTADOS

Por lo tanto, a continuación nos preguntamos si la degradación autofágica de SOX9 observada tras el bloqueo del eje MDK/ALK en GICs se debió a un reclutamiento selectivo de este factor de transcripción al autofagosoma. Como se muestra en la **Figura R26D**, LC3 inmunoprecipitó junto a SOX9 en células GH2 no tratadas y esta interacción fue potenciada tras la inhibición de las proteasas lisosomales, lo que sugiere que la autofagia está involucrada en la regulación basal de los niveles de SOX9 en las GICs. Además, la interacción de SOX9 y LC3 se redujo drásticamente tras la inhibición farmacológica de MDK y la posterior degradación autofágica de este factor de transcripción, mientras que la incubación con los inhibidores de las proteasas lisosomales previno esta degradación y restauró la interacción entre SOX9 y LC3.

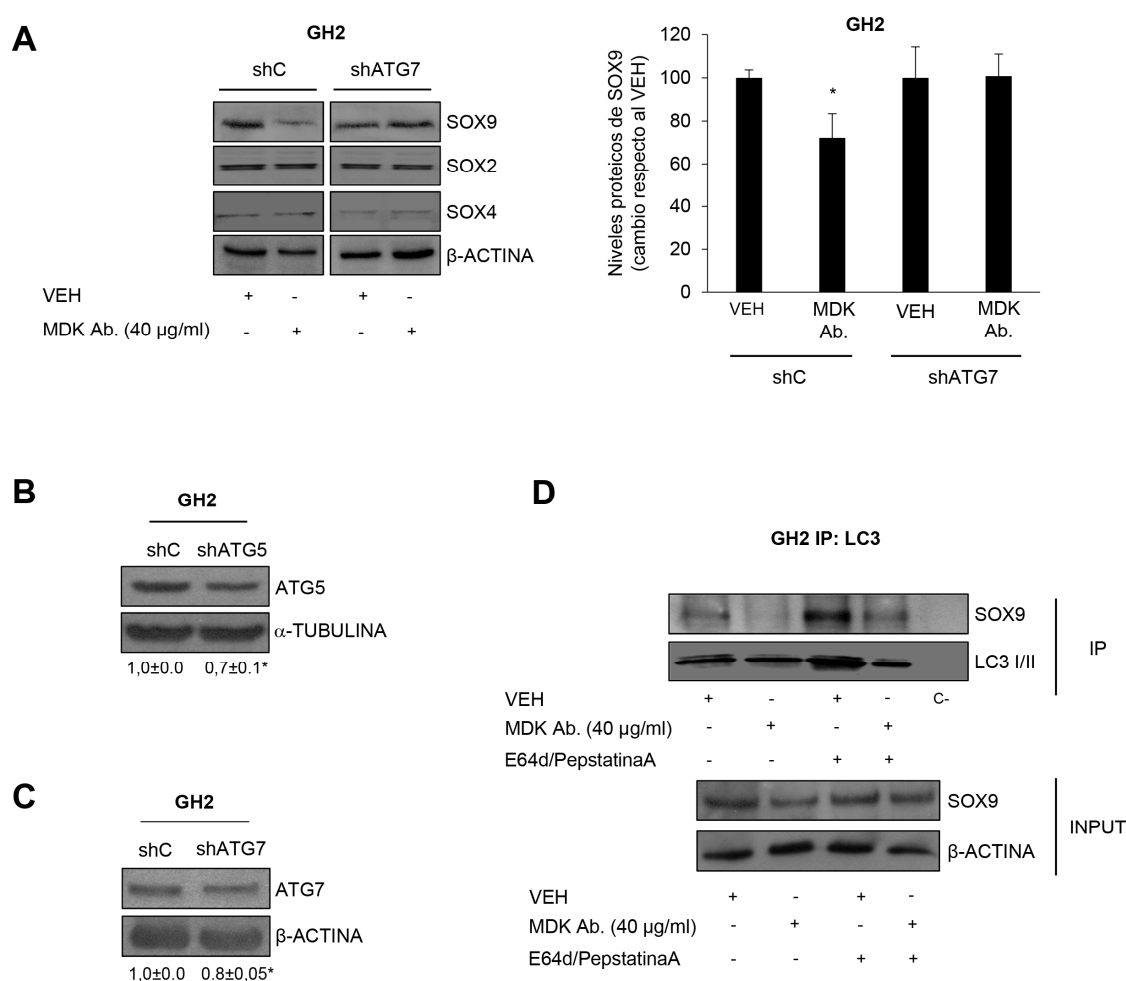


Figura R26. El bloqueo del eje MDK/ALK en GICs induce la degradación autofágica de SOX9

(A) Efecto de la incubación con MDK Ab. (40 µg/ml; 24h) sobre los niveles proteicos de SOX9, SOX2 y SOX4 en células GH2 transducidas de forma estable con un *shC* o un *shATG7* de expresión constitutiva. **Panel izquierdo:** se muestra un Western blot representativo (n=3). **Panel derecho:** análisis densitométrico de los niveles de SOX9. Se muestra como la relación entre los niveles de SOX9 y β-ACTINA (media ± SEM; n=5). * P < 0,05 respecto a las células GH2 *shC* VEH. **(B-C)** Niveles proteicos de ATG5 (**panel B**) o ATG7 (**panel C**) en células GH2 transducidas de forma estable con un *shATG5* o un *shATG7* de expresión constitutiva, respectivamente. Se muestra un Western blot representativo (n=3), que incluye una cuantificación de los niveles proteicos. * P < 0,05 respecto a las células *shC*. **(D)** Niveles de proteína de SOX9 y LC3 (I/II) tras la inmunoprecipitación de células GH2 no tratadas o pretratadas durante 1 hora con E64d (10 µM) y pepstatina A (10 µg/ml) y posteriormente incubadas con un anticuerpo neutralizante de MDK (MDK Ab., 40 µg/ml) durante 24 horas (n=2).

En resumen, estas observaciones demuestran que el bloqueo del eje MDK/ALK estimula la degradación de SOX9 a través de la vía autofagia-lisosoma en cultivos de GICs, lo que constituye un evento clave para la pérdida de las propiedades *stem-like* que caracterizan a estas células.

- Objetivo 4: Análisis de la eficacia terapéutica del tratamiento con inhibidores del eje MDK/ALK individualmente o en combinación con otros agentes antitumorales en modelos preclínicos de GBM

4.1 La inhibición farmacológica del receptor ALK reduce el crecimiento de tumores subcutáneos generados con GICs

Basándonos en el efecto ejercido por los inhibidores del eje MDK/ALK sobre la capacidad de proliferación y auto-renovación de distintos cultivos de GICs *in vitro*, nos preguntamos si el bloqueo farmacológico de este eje podría utilizarse como estrategia terapéutica para actuar sobre la población de GICs *in vivo*. Para ello estudiamos el efecto ejercido por 2 inhibidores de la actividad tirosina-quinasa de ALK, crizotinib y lorlatinib, sobre el crecimiento de tumores subcutáneos generados con GICs. La administración oral de crizotinib (12,5 mg/kg/día) o lorlatinib (25 mg/kg/día) redujo significativamente el crecimiento de tumores generados con células 12012 (**Figura R27A**). El análisis posterior de los tumores extraídos al final del experimento reveló que el tratamiento con crizotinib (**Figura R27B**) o lorlatinib (**Figura R27C**) redujo los niveles de expresión de marcadores de células progenitoras neurales como NESTINA, MSI-1, SOX2 y SOX9, lo que sugiere que el efecto antitumoral mostrado por los inhibidores farmacológicos de ALK se debe, al menos en parte, a su capacidad para actuar sobre la población de GICs. Además, y en línea con los resultados encontrados *in vitro*, el tratamiento con crizotinib o lorlatinib incrementó de forma significativa los niveles de autofagia de estos tumores (**Figura R28A**) y redujo de forma marcada su capacidad proliferativa (medida como niveles de Ki67 (**Figura R28B-C**). Adicionalmente, valoramos los niveles de CD31 (un marcador de angiogénesis) en estas muestras, ya que la activación del receptor ALK se ha relacionado con un incremento de la vascularización tumoral. El tratamiento con crizotinib redujo los niveles de CD31 (**Figura R28D**), sugiriendo que los inhibidores de ALK son capaces de disminuir también la capacidad angiogénica de los tumores generados con GICs.

4.2 La combinación de inhibidores del eje MDK/ALK y otros agentes antitumorales elimina la población de GICs *in vitro*

Los resultados mostrados hasta el momento revelan que la inhibición del eje MDK/ALK reduce la capacidad de proliferación y auto-renovación de distintos cultivos de GICs, pero no consigue eliminar estas poblaciones celulares, lo que podría considerarse uno de los principales objetivos desde el punto de vista terapéutico. Asimismo, múltiples evidencias han demostrado que altos niveles de expresión de MDK (y de su receptor ALK) se han correlacionado con una mayor resistencia de determinados tipos de tumores a la acción de distintos agentes quimioterapéuticos habitualmente utilizados (Kang, 2004; Kang et al., 2007; Mirkin et al., 2005; Zhang et al., 2017). Por estos motivos, nos preguntamos si el bloqueo farmacológico del eje MDK/ALK podría sensibilizar la población de GICs a la acción de otros fármacos con propiedades antitumorales.

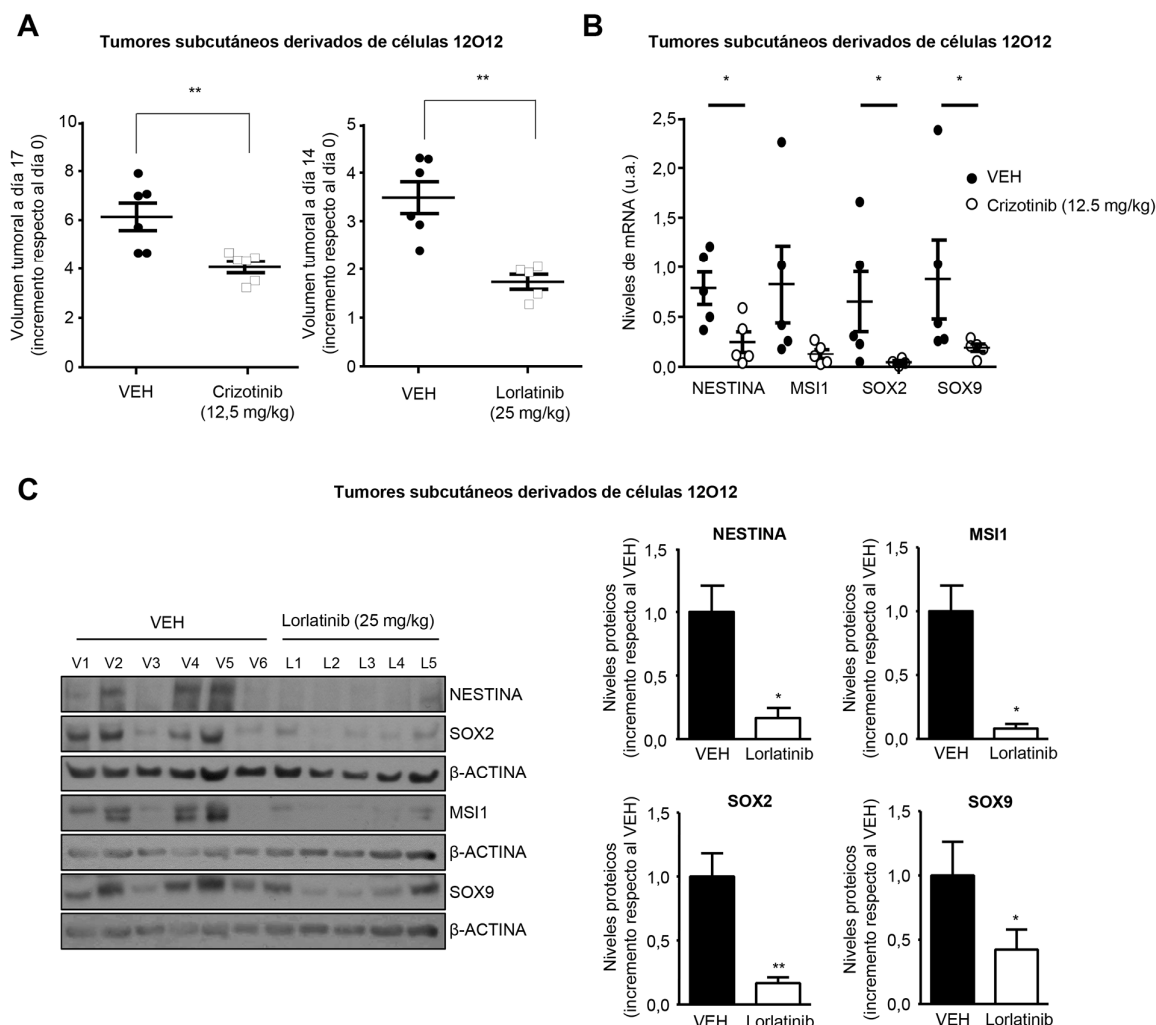


Figura R27. La inhibición farmacológica de ALK reduce el crecimiento de tumores subcutáneos derivados de GICs y disminuye la expresión de marcadores “stem-like” *in vivo*

(A) Efecto de la administración de crizotinib (12,5 mg/kg/día, **panel izquierdo**) o lorlatinib (25 mg/kg/día, **panel derecho**) sobre el volumen de tumores generados mediante inyección subcutánea de 2×10^6 células 12O12 en el flanco derecho de ratones inmunodeficientes. Los datos corresponden al volumen de los tumores en el último día del tratamiento y se representan como el incremento en el volumen tumoral con respecto al día 0 \pm SEM. ** $P < 0,01$ respecto a los tumores tratados con VEH. **(B-C)** Efecto de la administración de crizotinib (**panel B**) o lorlatinib (**panel C**) en los niveles de mRNA y proteína, respectivamente, de NESTINA, MUSASHI-1 (MSI1), SOX2 y SOX9 en muestras derivadas de los tumores subcutáneos una vez finalizado el tratamiento. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ respecto a los tumores tratados con VEH.

4.2.1 El bloqueo farmacológico de MDK potencia la acción de los cannabinoides sobre distintas poblaciones de GICs *in vitro*

Con la finalidad de comprobar esta hipótesis, analizamos el efecto producido por la combinación de inhibidores del eje MDK/ALK y cannabinoides, que como se ha citado anteriormente, son capaces de ejercer un potente efecto antitumoral en modelos celulares y animales de glioma (revisado en Velasco et al., 2012). Estudios previos llevados a cabo por nuestro grupo de investigación, y resultados descritos en esta tesis, han demostrado que altos

niveles de MDK se asocian a una elevada resistencia a la acción antitumoral de los cannabinoides en líneas celulares y en cultivos primarios derivados de GBM (Lorente et al. 2011).

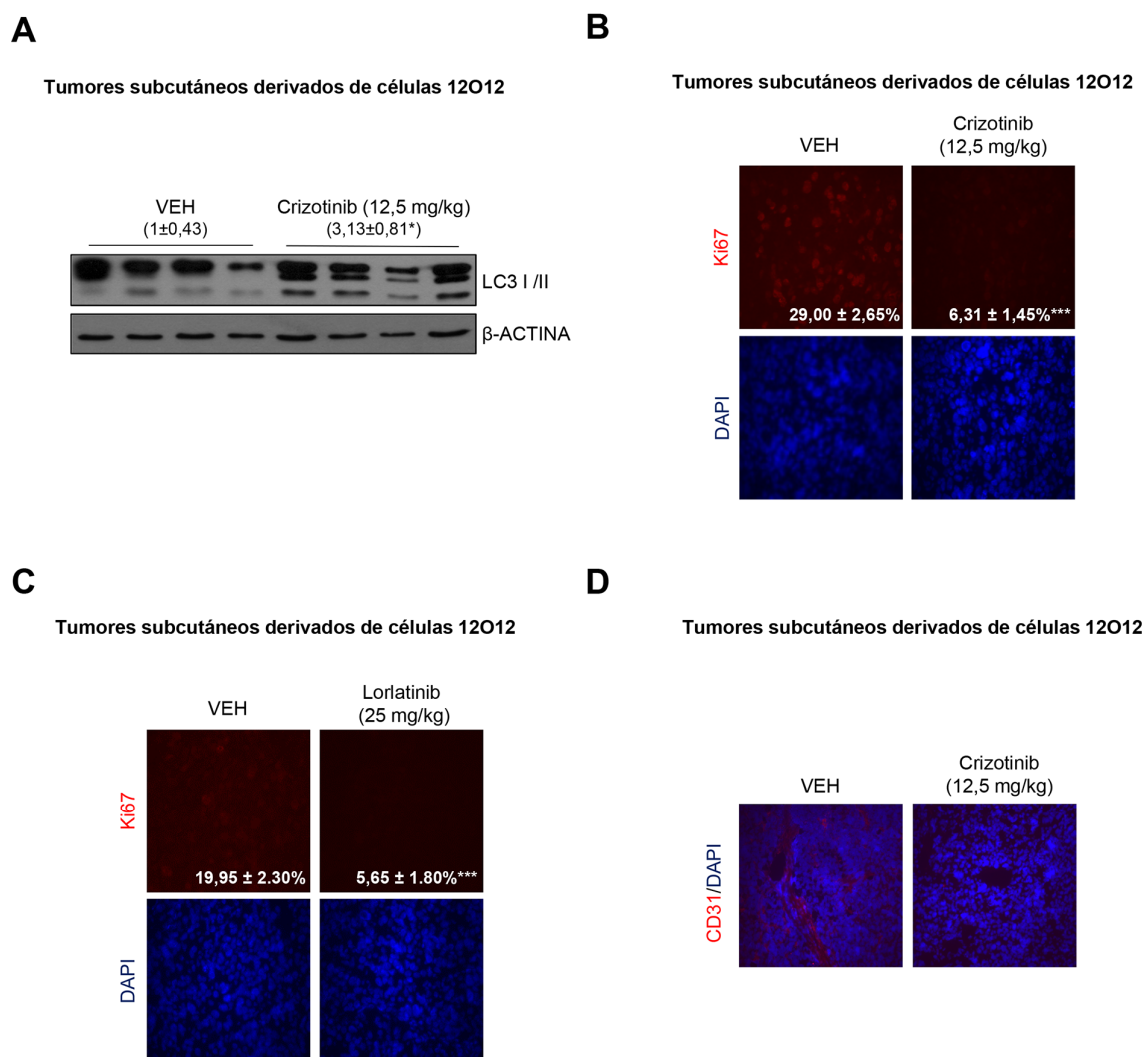


Figura R28. La inhibición farmacológica de ALK estimula la autofagia y reduce la proliferación y la angiogénesis de tumores subcutáneos derivados de GICs

(A) Efecto de la administración oral de crizotinib (12,5 mg/kg/día) sobre los niveles de LC3-I/II (determinados mediante Western blot) en tumores generados mediante la inyección subcutánea de 2×10^6 células 12O12 en el flanco derecho de ratones inmunodeficientes. Se muestra un Western blot representativo en el que se incluye el análisis densitométrico de los niveles de LC3 tomando como referencia uno de los animales tratados con VEH (media ± SEM, n=4). **(B-C)** Efecto de la administración oral de crizotinib (12,5 mg/kg/día, **panel B**) o lorlatinib (25 mg/kg/día, **panel C**) en la proliferación (determinada mediante inmunotinción con Ki67) de muestras procedentes de estos tumores. Los valores en cada imagen corresponden al porcentaje de células Ki67 (+) respecto al número total de núcleos en cada campo (media ± SEM), mostrándose imágenes representativas. Se analizaron al menos 6 campos distintos por tumor y 5 tumores distintos por condición. **(D)** Efecto de la administración oral de crizotinib (12,5 mg/kg/día) en la angiogénesis (determinada mediante inmunotinción con CD31) de muestras procedentes de estos tumores. Se muestran imágenes representativas para cada condición experimental. * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$ respecto a los tumores tratados con VEH.

De este modo, combinar inhibidores farmacológicos de MDK con cannabinoides podría constituir una buena estrategia terapéutica para actuar sobre esta población de GICs altamente resistente a cannabinoides.

En primer lugar, y en el contexto de una colaboración establecida con la empresa farmacéutica australiana *CellMid*, valoramos la eficacia de la combinación de cannabinoides con anticuerpos neutralizantes de MDK (IP9 e IP10 diseñados frente al extremo N terminal de la proteína, así como IP14 y su forma humanizada CAB102, dirigidos frente a su extremo C terminal)(**Figura R29A**) en ensayos de viabilidad celular. En una primera aproximación, utilizando un ensayo que permite evaluar el efecto de los tratamientos en múltiples condiciones experimentales de forma simultánea, encontramos que los anticuerpos que actuaban sobre el extremo N terminal de la MDK (IP9 e IP10) potenciaron el efecto ejercido por el THC sobre la viabilidad de GICs en mayor medida en que lo hizo el tratamiento con los anticuerpos generados contra el extremo C terminal de la MDK (IP14 o CAB102) (**Figura R29B**). Tras esta prueba inicial, y con la finalidad de evaluar de una forma más precisa la acción de estas combinaciones sobre la población de GICs, incubamos células GH2 durante un tiempo más prolongado con estos fármacos y determinamos su efecto sobre la capacidad de autorrevación de estas células. El tratamiento individual con dosis submáximas de IP10, IP14 o THC inhibió ligeramente el crecimiento (**Figura R29C**) así como la capacidad de autorrenovación (**Figura R29D**) de este cultivo. Por su parte, el tratamiento con IP10 sensibilizó estas células a la acción del THC, mientras que el tratamiento con IP14 no potenció el efecto ejercido por los cannabinoides en ambos tipos de experimentos.

Por último, seleccionamos uno de los anticuerpos dirigidos frente al extremo N terminal de MDK (y que ha demostrado tener una mayor eficacia en combinación con cannabinoides que aquellos dirigidos frente al extremo C terminal) y lo combinamos con un extracto cannabinoide que contiene THC y CBD en proporción 1:1. Como hemos descrito con anterioridad en esta Tesis, la utilización de esta combinación de cannabinoides posee una importante relevancia terapéutica ya que se asemeja al fármaco Sativex, en fase de ensayos clínicos en pacientes con GBM. En línea con los resultados obtenidos con el THC, la administración combinada del anticuerpo neutralizante de MDK IP10 (MDK Ab.) y el extracto cannabinoide THC:CBD 1:1 conduce a la eliminación completa de los cultivos de GICs GH2 (**Figura R30A**) y 12012 (**Figura R30B**).

En resumen, estos datos revelan que el bloqueo de la señalización dependiente de MDK mediante la utilización de anticuerpos neutralizantes de este factor de crecimiento dirigidos frente a su extremo N terminal sensibiliza distintas poblaciones de GICs al tratamiento con cannabinoides, permitiendo así su eliminación.

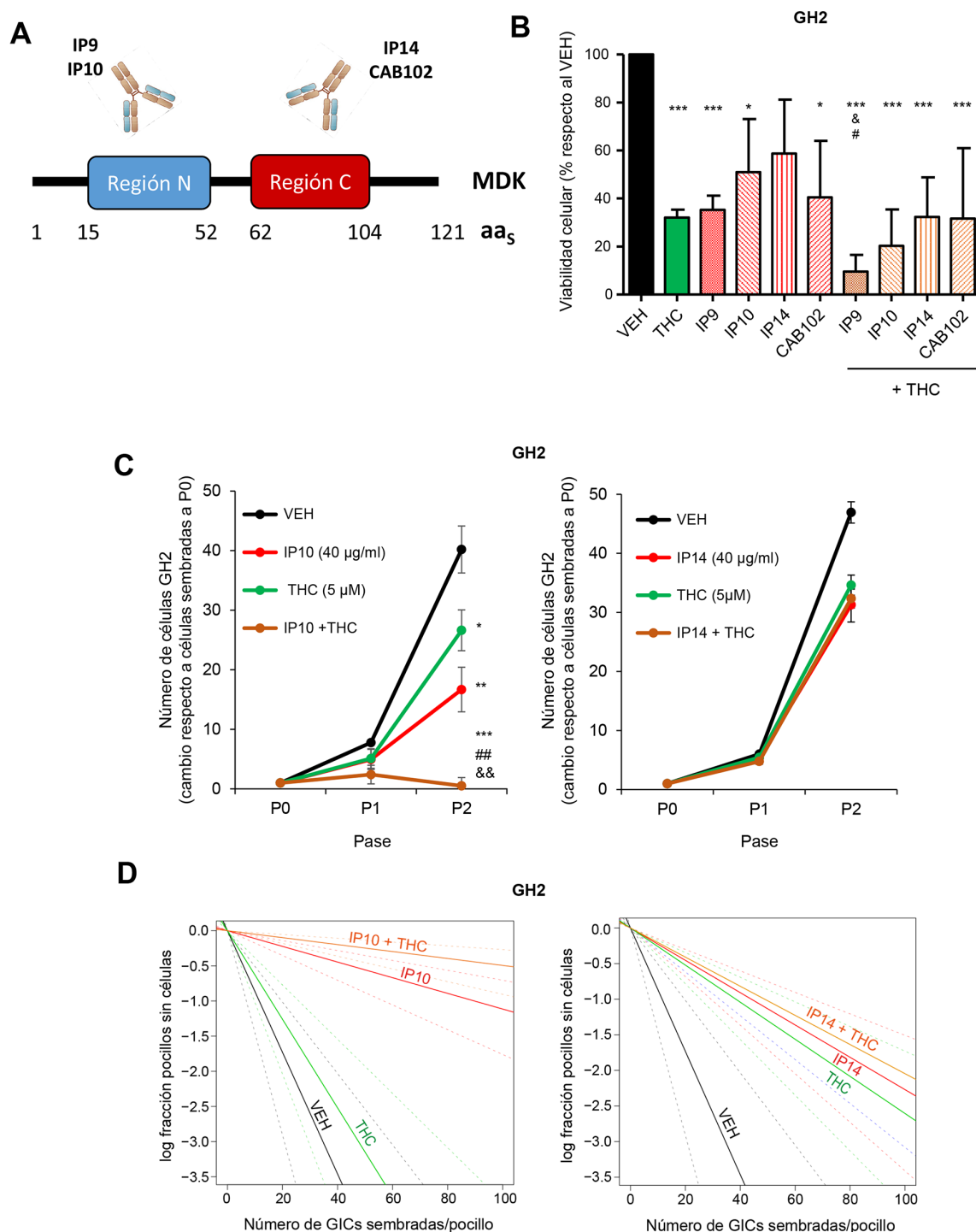


Figura R29. Los anticuerpos neutralizantes de MDK dirigidos frente al N terminal de la proteína potencian la acción antitumoral del THC

(A) Esquema representativo de los anticuerpos neutralizantes de MDK y la región de la proteína frente a la que han sido diseñados: IP9; IP10 región N terminal; IP14, CAB102 región C terminal. **(B)** Efecto de la incubación con distintos anticuerpos neutralizantes de MDK (45 µg/ml) y THC (7,5 µM) durante 72h sobre la viabilidad de células GH2 (determinada mediante ensayos de WST, media ± SEM, n=3). **(C-D)** Efecto de la incubación con anticuerpos neutralizantes de MDK a una concentración de 40 µg/ml (IP10 **panel izquierdo**, IP14 **panel derecho**) y THC (5 µM) sobre el número total de células GH2 durante 2 pases consecutivos (**panel C**, n=3), o sobre su capacidad de autorrenovación (determinada mediante ensayos de LDA, **panel D**, n=2). * P<0,05 ** P<0,01 *** P<0,001 respecto a células tratadas con VEH; & P<0,05; && P<0,01 respecto a células tratadas con THC; # P<0,05; ## P<0,01 respecto a células tratadas con IP10. El análisis estadístico correspondiente a los ensayos de LDA se omite por claridad y se muestra en el Anexo I.

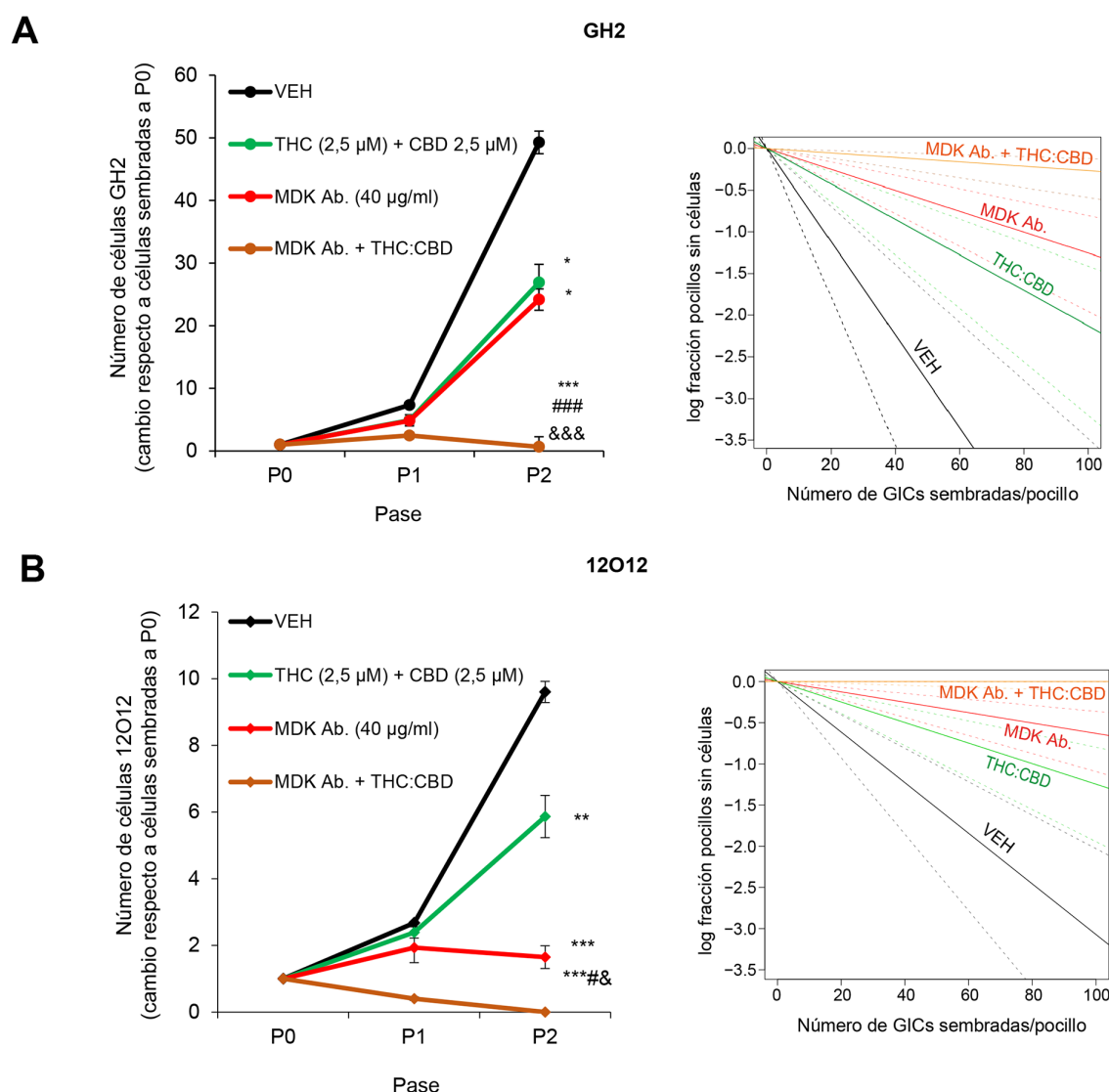


Figura R30. Los anticuerpos neutralizantes de MDK dirigidos frente al N terminal de la proteína potencian la acción antiproliferativa de extractos cannabinoides que contiene THC y CBD en proporción 1:1

(A-B) Efecto de la incubación con anticuerpos neutralizantes de MDK dirigidos frente al extremo N terminal de la proteína (MDK Ab., 40 $\mu\text{g/ml}$) y THC (2,5 μM) + CBD (2,5 μM) sobre el número total de células (**panel izquierdo**, media \pm SEM, $n=3$) o la capacidad de autorrenovación (determinada mediante LDA, **panel derecho**, $n=2$) de células GH2 (**panel A**) o 12O12 (**panel B**). * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$ respecto a células tratadas con VEH; & $P<0,05$; &&& $P<0,001$ respecto a células tratadas con THC:CBD; # $P<0,05$; ### $P<0,001$ respecto a células tratadas con MDK Ab. El análisis estadístico correspondiente a los ensayos de LDA se omite por claridad y se muestra en el Anexo I.

4.2.2 La inhibición farmacológica de ALK sensibiliza los cultivos de GICs al tratamiento con cannabinoides

Tras comprobar el potente efecto ejercido por la combinación de anticuerpos neutralizantes de MDK y cannabinoides en GICs, decidimos evaluar si estos resultados se reproducían utilizando inhibidores de la actividad tirosina-quinasa de ALK como TAE, crizotinib y lorlatinib. Como se muestra en la **Figura R31A**, el tratamiento con dosis submáximas de estos 3 inhibidores en combinación con cannabinoides (ya sea THC o extractos que contienen una proporción equivalente de THC y CBD) redujo de forma significativamente más acusada que los tratamientos individuales el número de células GH2.

Unos resultados muy similares se obtuvieron en otros cultivos de GICs, donde la combinación de THC:CBD con crizotinib o lorlatinib fue capaz de eliminar completamente la población de células 12012 así como de mantener, evitando su auto-renovación, la población inicial de células HCO1 (**Figura R31B**). Seguidamente, quisimos comprobar el efecto de estas combinaciones directamente sobre la capacidad de auto-renovación de estos cultivos mediante ensayos LDA. Como se observa en la **Figura R31C**, la combinación de THC:CBD (1:1) y crizotinib inhibió de forma prácticamente total la formación de esferas en células GH2, 12012 y HCO1.

En conjunto, estos datos sugieren que la utilización conjunta de inhibidores del eje MDK/ALK y cannabinoides podría ser utilizada como una estrategia para actuar de manera más eficaz sobre la población de GICs, contribuyendo así a su eliminación.

4.2.3 La administración combinada de inhibidores del eje MDK/ALK y THC promueve una autofagia citotóxica en GICs

A continuación, quisimos profundizar en los mecanismos moleculares subyacentes a la acción combinada de los inhibidores del eje MDK/ALK y cannabinoides. Los datos mostrados en esta tesis sugieren que el bloqueo del eje MDK/ALK induce autofagia en GICs. Por otro lado, se ha descrito que el THC promueve apoptosis a través de la activación de autofagia en células diferenciadas de glioma, por lo que nos planteamos si la combinación de ambos fármacos podría potenciar la respuesta autofágica, estimulando así la muerte celular observada en cultivos de GICs. Así, observamos que la incubación conjunta de anticuerpos neutralizantes de MDK dirigidos frente al extremo N terminal de la proteína (MDK Ab.) y THC durante 24 horas promovió una activación sinérgica de la autofagia en células GH2 (**Figura R32A**). Además, esta respuesta autofágica fue más prolongada que la inducida por cada uno de los fármacos por separado, puesto que tras 48 horas de incubación con anticuerpo y THC se mantienen unos niveles incrementados de LC3-II (**Figura R32B**). Igualmente merece la pena destacar que el tratamiento combinado con MDK Ab. y THC (**Figura R32C-D**) o con crizotinib y THC (**Figura R32D**) (pero no el tratamiento individual con estos compuestos) promovió la apoptosis en cultivos de GICs.

Con la finalidad de comprobar si la activación de autofagia es un evento necesario para la inducción de muerte celular en nuestros cultivos de GICs tras la combinación de inhibidores del eje MDK/ALK y cannabinoides, silenciámos de forma inducible (mediante la incubación con doxiciclina) la expresión de *ATG5*. La inhibición genética de la autofagia previno tanto el aumento en los niveles proteicos de CASPASA 3 activa (**Figura R33A-C**) como la eliminación

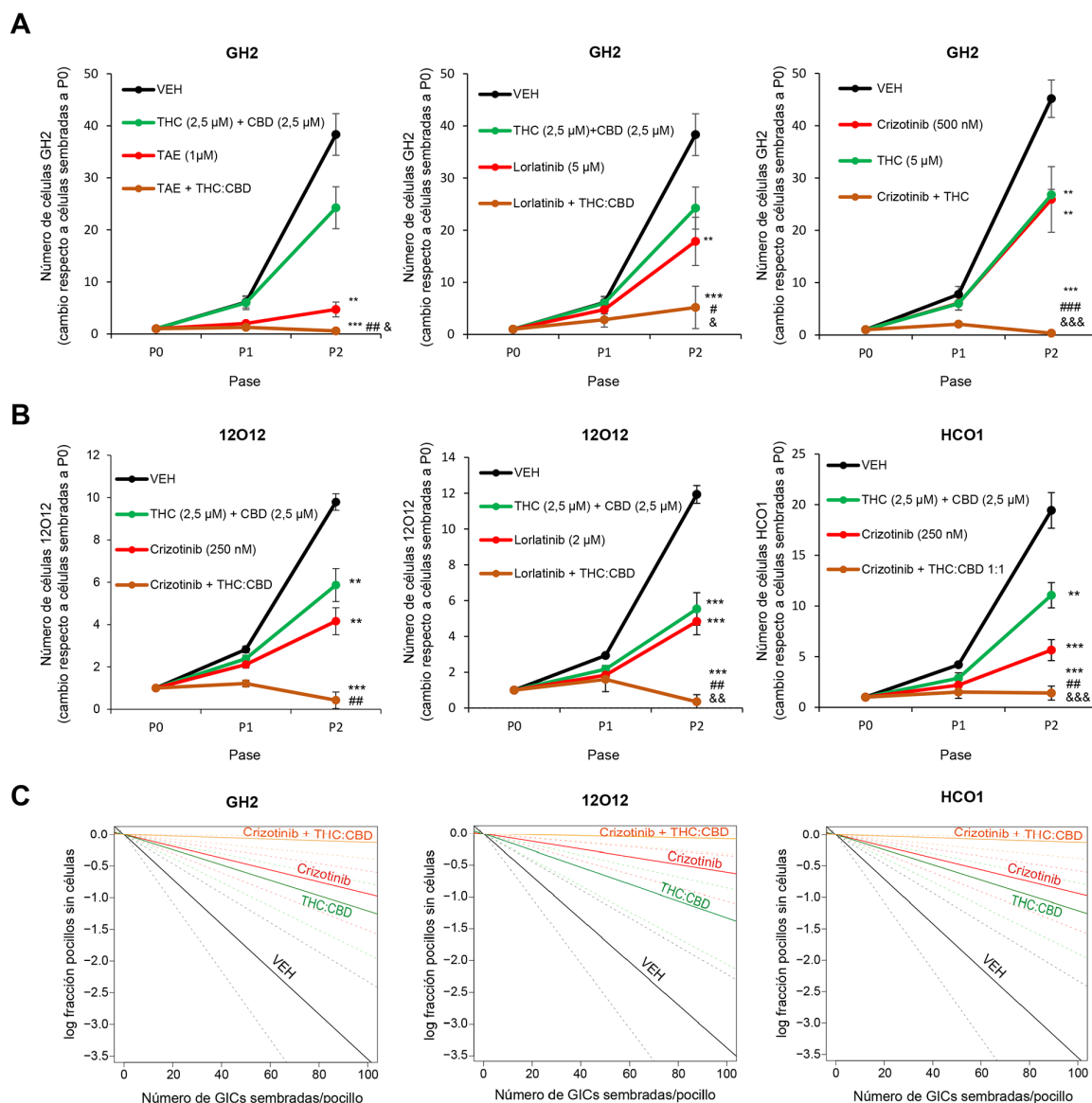


Figura R31. Los inhibidores de la actividad tirosina-quinasa de ALK potencian la acción antitumoral de los cannabinoides en distintos cultivos de GICs

(A-B) Efecto de la incubación con TAE, crizotinib, lorlatinib, THC o CBD, a la concentración indicada en cada caso, sobre el número total de células GH2, 12O12 y HCO1. Media \pm SEM (n=3). (C) Efecto de la incubación con crizotinib (500 nM) y THC (2,5 μ M) + CBD (2,5 μ M) sobre la capacidad de autorrenovación (determinada mediante LDA, n=2) de células GH2, 12O12 o HCO1. ** P<0,01; *** P<0,001 respecto a células tratadas con VEH; & P<0,05; && P<0,01; &&& P<0,001 respecto a células tratadas con THC:CBD; # P<0,05; ## P<0,01; ### P<0,001 respecto a células tratadas con TAE, crizotinib o lorlatinib. El análisis estadístico correspondiente a los ensayos de LDA se omite por claridad y se muestra en el Anexo I.

de la población de células GH2 promovida por la administración combinada del anticuerpo neutralizante de MDK y THC (**Figura R33D**).

Del mismo modo, el silenciamiento tanto de *ATG5* como de *ATG7* revirtió el efecto inhibitorio inducido por la combinación de THC con anticuerpos neutralizantes de MDK (**Figura R33E**) o crizotinib (**Figura R33F**) sobre la capacidad de auto-renovación de células GH2. Unos resultados muy similares se observaron tras la inhibición farmacológica de la

autofagia utilizando E64d y pepstatina A tanto en la inducción de apoptosis como en el crecimiento de células GH2 (**Figura R34A-B**).

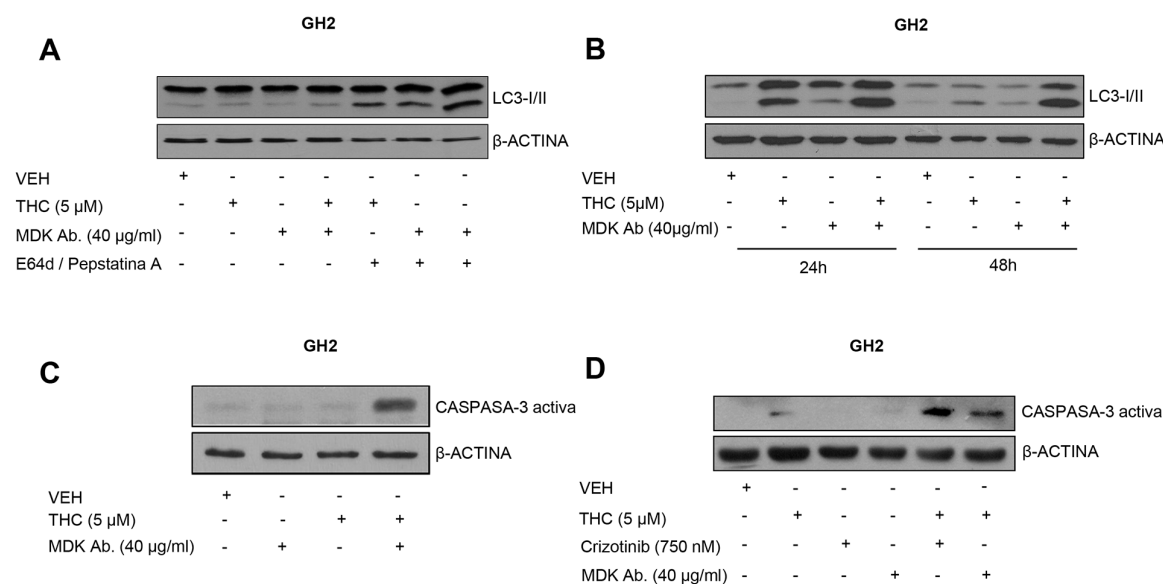


Figura R32. La combinación de anticuerpos neutralizantes de MDK y THC induce una activación sinérgica y prolongada de la autofagia en GICs

(A) Efecto de la incubación con un anticuerpo neutralizante de MDK (MDK Ab.) y THC durante 24 horas sobre la autofagia (medida como los niveles de LC3-I/II) en células GH2 no tratadas o pre-tratadas durante 1 hora con E64d (10 μ M) y pepstatina A (10 μ g/ml). **(B)** Efecto de la incubación con MDK Ab. y THC en los niveles de LC3-I/II de células GH2. **(C-D)** Efecto de la incubación con MDK Ab., THC (**panel C**) y crizotinib (**panel D**) durante 5 días en la apoptosis (medida como los niveles de CASPASA 3 activa) en células GH2. En todos los casos se muestra un Western blot representativo (n=3).

Estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio han demostrado que la síntesis de ceramida es una etapa clave para la activación de la autofagia citotóxica promovida por el THC en células de glioma (Carracedo et al., 2006; Salazar et al., 2009; Hernández-Tiedra et al., 2016). Por este motivo nos planteamos si la muerte celular observada tras la combinación de inhibidores del eje MDK/ALK y cannabinoides en GICs depende también de la síntesis *de novo* de esfingolípidos. El tratamiento con ISP-1, un inhibidor farmacológico de la enzima serina palmitoiltransferasa (SPT) que cataliza la primera etapa de la biosíntesis de esfingolípidos, previno la inducción de apoptosis promovida por el tratamiento combinado con crizotinib y THC (**Figura R34C**) así como por la combinación de anticuerpos neutralizantes de MDK y THC (**Figura R34D**).

Por último, y considerando como hemos citado previamente que trabajamos con cultivos heterogéneos en los que están presentes células en diferente estado de diferenciación, quisimos comprobar si las células que expresan marcadores típicos de progenitores neurales como CD133, y que se hipotetiza que son más resistentes a los tratamientos individuales, sufren también apoptosis tras la administración combinada de inhibidores del eje MDK/ALK y THC. Los experimentos llevados a cabo mediante citometría de flujo muestran que la incubación de células GH2 con ambos fármacos durante 3 días promovió la apoptosis de células CD133 (+) (**Figura R34E**). Estos datos demuestran que la

RESULTADOS

inhibición de la señalización por MDK en combinación con cannabinoides es capaz de actuar sobre las células/poblaciones celulares que poseen un fenotipo más *stem-like* dentro de los cultivos de GICs estudiados, promoviendo su apoptosis.

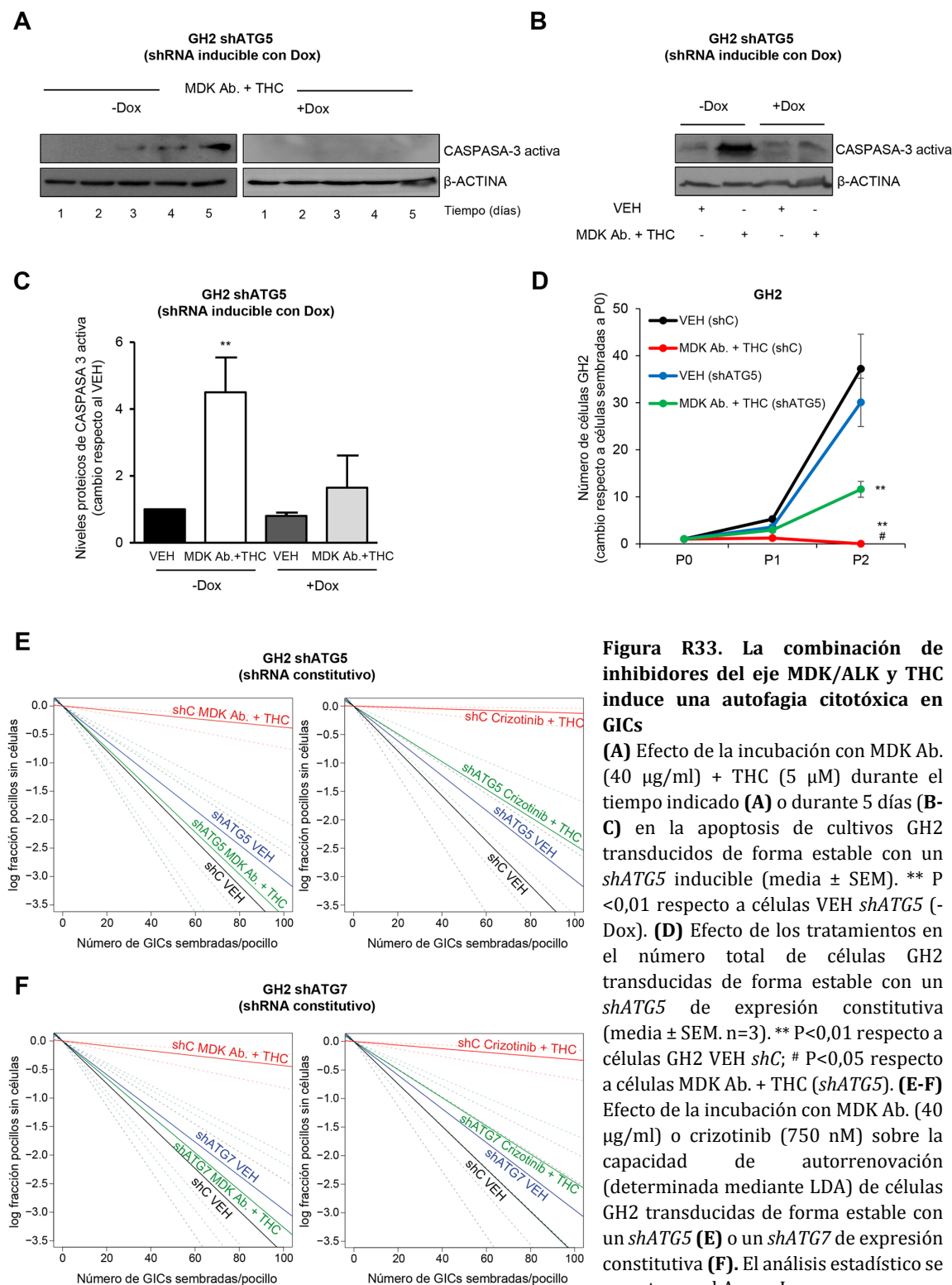


Figura R33. La combinación de inhibidores del eje MDK/ALK y THC induce una autofagia citotóxica en GICs

(A) Efecto de la incubación con MDK Ab. (40 μ g/ml) + THC (5 μ M) durante el tiempo indicado (A) o durante 5 días (B-C) en la apoptosis de cultivos GH2 transducidos de forma estable con un *shATG5* inducible (media \pm SEM). ** $P < 0,01$ respecto a células VEH *shATG5* (-Dox). (D) Efecto de los tratamientos en el número total de células GH2 transducidas de forma estable con un *shATG5* de expresión constitutiva (media \pm SEM. $n=3$). ** $P < 0,01$ respecto a células GH2 VEH *shC*; # $P < 0,05$ respecto a células MDK Ab. + THC (*shATG5*). (E-F) Efecto de la incubación con MDK Ab. (40 μ g/ml) o crizotinib (750 nM) sobre la capacidad de autorrenovación (determinada mediante LDA) de células GH2 transducidas de forma estable con un *shATG5* (E) o un *shATG7* de expresión constitutiva (F). El análisis estadístico se muestra en el Anexo I.

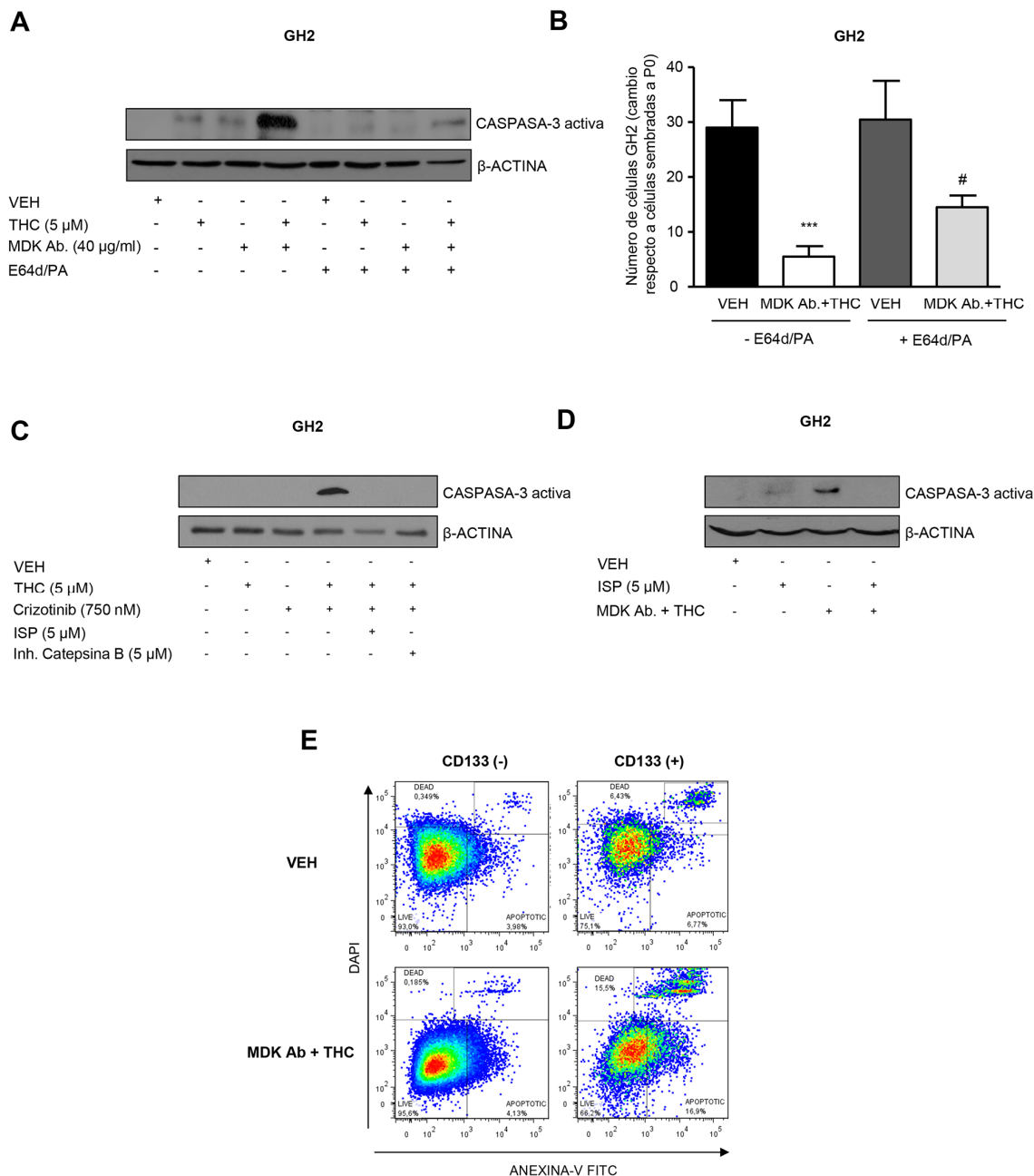


Figura R34. La combinación de inhibidores del eje MDK/ALK y THC induce una autofagia citotóxica en GICs dependiente de la síntesis de novo de ceramida

(A-B) Efecto de la incubación con un anticuerpo neutralizante de MDK (MDK Ab.) y THC en la apoptosis (medida como niveles de CASPASA 3 activa mediante Western blot, 5 días, **panel A**) y en el número total de células GH2 (media \pm SEM, **panel B**) no tratadas o pre-tratadas durante 1 hora con E64d (10 μ M) y pepstatina A (PA, 10 μ g/ml). n=3. ***P < 0,001 respecto a VEH -E64d/PA; #P <0,05 respecto a VEH +E64d/PA. **(C-D)** Efecto de la incubación con crizotinib (750 nM, **panel C**) o MDK Ab. (40 μ g/ml, **panel D**) en combinación con THC, durante 5 días, en los niveles de CASPASA 3 activa de células GH2 no tratadas o pre-tratadas durante 1 hora con el inhibidor de la enzima serina-palmitoil transferasa (ISP) o con el inhibidor de catepsina B (Inh. Catepsina B). En ambos casos se muestra un Western blot representativo (n=3). **(E)** Efecto de la incubación con MDK Ab. (40 μ g/ml) y THC (5 μ M) durante 3 días en la apoptosis (determinada mediante citometría de flujo) de células GH2 que presentan un marcaje positivo o negativo para la proteína CD133.

Estos resultados demuestran que la combinación de inhibidores del eje MDK/ALK y cannabinoides induce una muerte celular mediada por autofagia que promueve la eliminación de la población de GICs *in vitro*.

4.2.4 La inhibición farmacológica de ALK en combinación con TMZ elimina las GICs

Actualmente, el tratamiento quimioterapéutico estándar frente al GBM se basa en la utilización del agente alquilante TMZ. Dado que, como se ha citado previamente, las GICs son especialmente resistentes a la acción de la TMZ y que la activación del eje MDK/ALK se ha asociado a una mayor resistencia a la acción de distintos agentes quimioterapéuticos, nos preguntamos si el tratamiento con inhibidores del eje MDK/ALK podría sensibilizar nuestros cultivos de GICs a la acción antitumoral de la TMZ. En concreto, nos centramos en analizar la eficacia de la TMZ en combinación con crizotinib, ya que éste se encuentra aprobado por la FDA para el tratamiento de distintas neoplasias, lo que podría facilitar o acelerar su aprobación para el tratamiento del GBM. Además, en la actualidad se encuentra en marcha un ensayo clínico en el que se está evaluando la seguridad y la acción antitumoral ejercida por la combinación de crizotinib, TMZ y radioterapia en pacientes con GBM recién diagnosticado (NCT02270034).

El tratamiento individual con TMZ no tuvo ningún impacto sobre la capacidad de auto-renovación y generación de neuroesferas en cultivos GH2 (**Figura R35A**) y 12012 (**Figura R35B**). Por el contrario, el efecto mostrado por el crizotinib se vio significativamente potenciado cuando se combinó con TMZ, llegando a eliminar prácticamente por completo la formación de neuroesferas. En consonancia con estos datos, la combinación de dosis submáximas de ambos fármacos activó de forma muy marcada la apoptosis en células GH2 (**Figura R35C**).

En conjunto, estos datos muestran que el bloqueo farmacológico del eje MDK/ALK, en combinación bien con cannabinoides o bien con TMZ, ejerce un potente efecto sobre la capacidad de auto-renovación de las GICs, lo que lleva a una reducción muy importante o a la completa eliminación de estas células *in vitro*.

4.3 La combinación de inhibidores del eje MDK/ALK con cannabinoides o TMZ posee un potente efecto antitumoral en tumores derivados de GICs

A continuación, decidimos analizar el potencial terapéutico de la combinación de inhibidores del eje MDK/ALK con cannabinoides y TMZ. Para ello evaluamos la acción antitumoral ejercida por estos tratamientos combinados sobre el crecimiento de tumores generados mediante la inyección subcutánea o intracraneal de GICs.

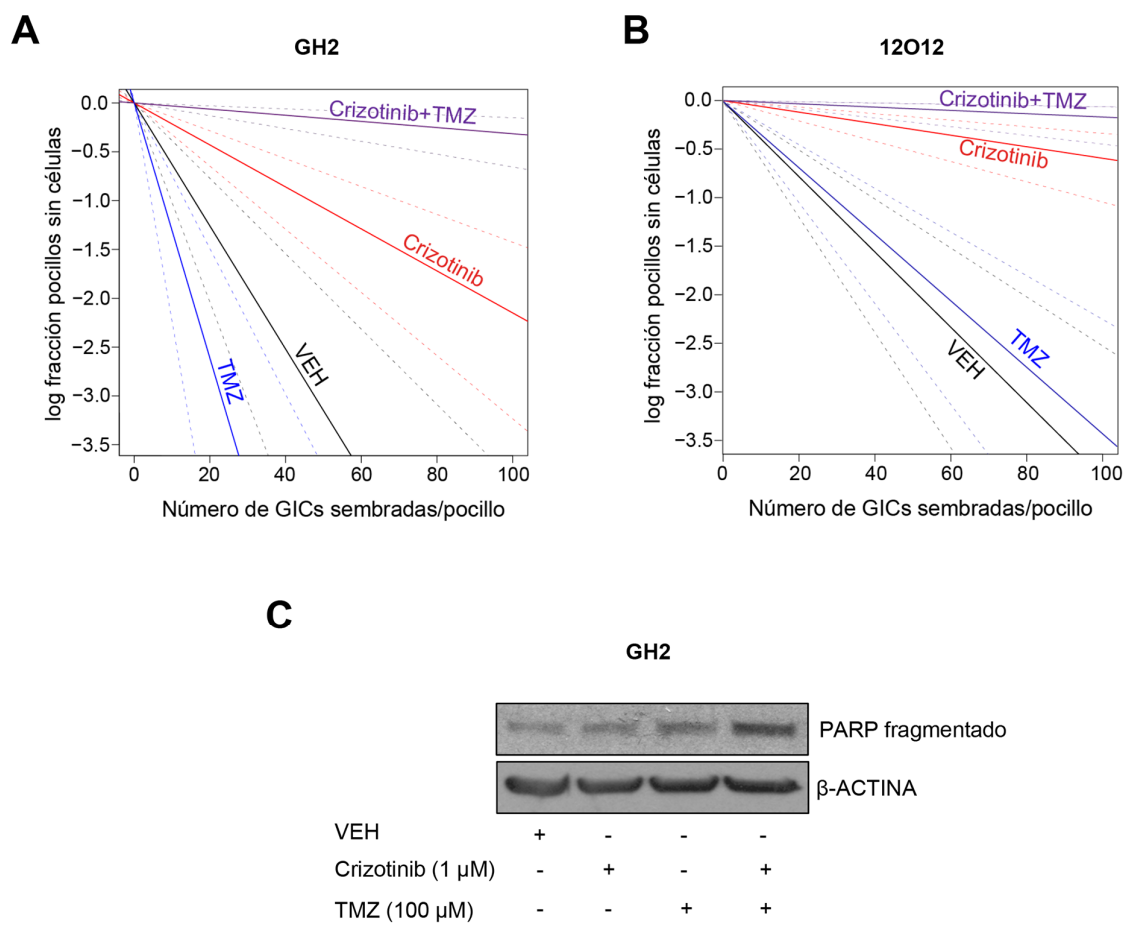


Figura R35. La combinación de crizotinib y TMZ elimina la capacidad de formación de esferas de las GICs **(A-B)** Efecto de la incubación con crizotinib (500 nM) y temozolomida (TMZ, 100 μ M **panel A**, 20 μ M **panel B**) en la capacidad de autorrenovación (determinada mediante LDA) de células GH2 (**panel A**) o 12012 (**panel B**). Se muestra un ensayo representativo (n=2). El análisis estadístico se omite por claridad y se muestra en el Anexo I. **(C)** Efecto de la incubación con crizotinib (1 μ M) y TMZ (100 μ M) durante 48 horas en la apoptosis (determinada mediante los niveles de PARP fragmentado) de células GH2. Se muestra un Western blot representativo (n=3).

4.3.1 El bloqueo farmacológico de MDK en combinación con cannabinoides reduce el crecimiento de tumores subcutáneos generados con GICs

En primer lugar, nos preguntamos si la inhibición farmacológica de MDK, en combinación con cannabinoides, podría ser una buena estrategia terapéutica para el tratamiento de estos tumores. Para ello, inyectamos subcutáneamente células 12012 en el flanco derecho de ratones inmunodeficientes y estos animales se trataron con los anticuerpos neutralizantes de MDK IP10 o CAB102 de forma intraperitoneal 2 veces por semana (15 mg/kg/día) en combinación con una administración diaria oral de THC (7,5 mg/kg/día). Como se muestra en la **Figura R36A**, el anticuerpo neutralizante de MDK IP10, a diferencia del anticuerpo CAB102, potenció el efecto antitumoral ejercido por el tratamiento con THC, en línea con los resultados obtenidos *in vitro*. Además, el tratamiento combinado de IP10 + THC redujo de forma significativa los niveles proteicos de MDK presentes en los tumores extraídos tras la finalización del experimento, no observándose cambios tras el tratamiento con THC (**Figura R36B**). Estos datos, aunque preliminares, sugieren que el tratamiento

RESULTADOS

intraperitoneal con anticuerpos neutralizantes de MDK dirigidos frente al extremo N terminal de esta proteína es capaz de alcanzar una dosis suficientemente elevada en el tumor como para disminuir los niveles de MDK presentes en el mismo, lo que se traduce en una reducción significativa del crecimiento tumoral.

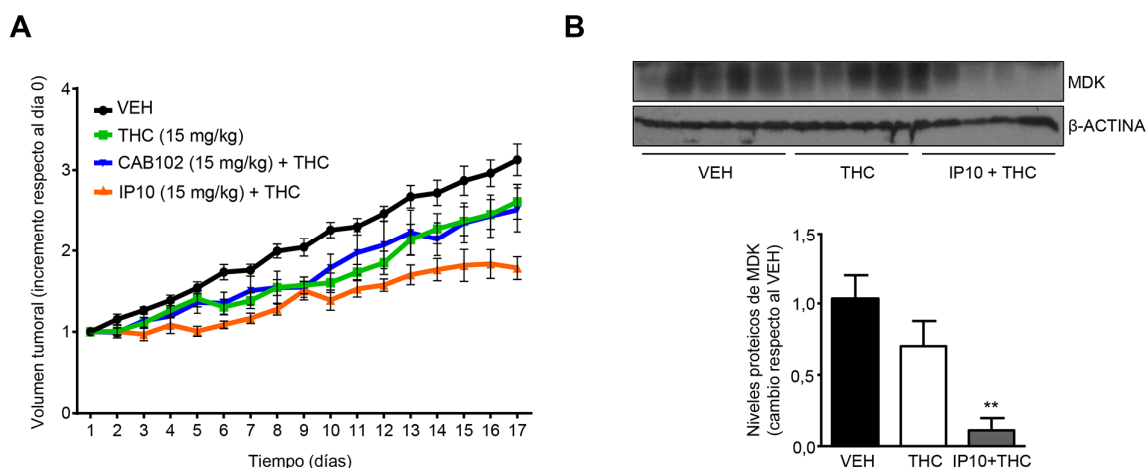


Figura R36. La administración combinada de anticuerpos neutralizantes de MDK y THC reduce fuertemente el crecimiento de tumores subcutáneos derivados de GICs

(A) Efecto del tratamiento con los anticuerpos neutralizantes de MDK IP10 y CAB102 (15 mg/kg, 2 veces por semana mediante inyección intraperitoneal) y THC (15 mg/kg/día, tratamiento oral diario) en el crecimiento de tumores generados mediante la inyección subcutánea de 2×10^6 células 12012 en el flanco derecho de ratones inmunodeficientes (media \pm SEM; $n=9$). El tratamiento con THC produjo un efecto significativamente distinto del VEH entre los días 7 al 12 ($P < 0,01$) y entre los días 13 al 17 ($P < 0,05$). El tratamiento con Mdk Ab. + THC produjo un efecto significativamente distinto del VEH a día 5 ($P < 0,01$) y desde el día 6 hasta el final del tratamiento ($P < 0,001$) así como del tratamiento con THC desde el día 13 al 15 ($P < 0,01$) y los días 16 y 17 ($P < 0,001$). **(B)** Efecto de los distintos tratamientos en los niveles proteicos de MDK (determinados mediante Western blot) presentes en lisados de tumores obtenidos tras la finalización del experimento. **Panel superior:** se muestra un Western blot representativo. **Panel inferior:** análisis densitométrico de los niveles proteicos de MDK. Los datos se representan como la relación entre los niveles de MDK y β -ACTINA para cada condición experimental tomando como referencia uno de los ratones VEH (media \pm SEM). ** $P < 0,01$ respecto a los tumores tratados con VEH.

4.3.2 El tratamiento con el inhibidor de ALK crizotinib en combinación con cannabinoides o TMZ reduce el crecimiento de tumores subcutáneos generados con GICs

A continuación, valoramos el efecto producido por el tratamiento oral con dosis submáximas de crizotinib (12,5 mg/kg/día) en combinación con un extracto cannabinoide compuesto por THC (7,5 mg/kg/día) y CBD (7,5 mg/kg/día) en una proporción 1:1 sobre tumores subcutáneos generados con células 12012. La administración combinada de crizotinib y cannabinoides redujo el crecimiento de estos tumores de una forma significativamente mayor que los tratamientos individuales (**Figura R37A**). Del mismo modo, aunque el tratamiento con dosis submáximas de TMZ (5 mg/kg/2 veces por semana) disminuyó notablemente el crecimiento de los tumores, el tratamiento combinado con crizotinib y TMZ ejerció un efecto antitumoral significativamente mayor (**Figura R37B**).

Además, en ambos casos, la combinación de crizotinib con cannabinoides o TMZ activó la apoptosis de una manera significativamente más potente que los tratamientos individuales como se observa en la **Figura R37C**, donde se cuantifica el número de células TUNEL positivas en muestras de estos tumores obtenidas al final de los correspondientes tratamientos.

Estas observaciones indican que la administración combinada de crizotinib con cannabinoides o con TMZ posee un fuerte efecto antitumoral en modelos animales de glioma generados mediante la inyección subcutánea de GICs.

4.3.3 El inhibidor de ALK lorlatinib potencia el efecto antitumoral ejercido por cannabinoides y TMZ sobre tumores subcutáneos generados con GICs

Uno de los inhibidores de la actividad tirosina-quinasa de ALK que presenta un mayor atractivo desde el punto de vista clínico es el lorlatinib, que exhibe una serie de ventajas con respecto a la utilización del crizotinib a pesar de no encontrarse aprobado para su uso clínico por la FDA. En primer lugar, es un inhibidor más específico de ALK, y en segundo lugar posee una mayor capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica, lo que le hace ser un candidato idóneo para el tratamiento de tumores intracraneales generados con células en las que el receptor ALK se encuentre sobreactivado, como es el caso de nuestros cultivos de GICs. Por estos motivos, decidimos comprobar la eficacia antitumoral mostrada por la combinación de este inhibidor con cannabinoides y TMZ sobre el crecimiento de tumores subcutáneos e intracraneales generados con células 12012.

De forma similar al efecto ejercido por el crizotinib, la administración de dosis efectivas de lorlatinib (25 mg/kg/día) en combinación con THC (7,5 mg/kg/día) y CBD (7,5 mg/kg/día) redujo el crecimiento de estos tumores subcutáneos (**Figura R38A**) y aumentó la apoptosis (**Figura R38B**) de una manera significativamente mayor que el tratamiento individual con cada uno de estos compuestos. Igualmente, la combinación de lorlatinib (25 mg/kg/día) y TMZ (5 mg/kg/2 veces por semana) exhibió un efecto antitumoral más marcado que los correspondientes tratamientos individuales (**Figura R38C**), aunque en este caso las diferencias observadas no fueron significativas, en gran medida debido al potente efecto mostrado por el tratamiento individual con TMZ. En cualquier caso, hay que destacar que la combinación de lorlatinib y TMZ promovió la regresión total de hasta un 40% de los tumores tratados, lo que a su vez imposibilitó el análisis posterior de los niveles de apoptosis en estos tumores.

A continuación, analizamos el efecto del lorlatinib en combinación con TMZ sobre tumores intracraneales generados con células 12012. El tratamiento con lorlatinib (25 mg/kg) no modificó la supervivencia de los ratones que portan estos tumores, pero sí potenció el efecto producido por el tratamiento con TMZ (5 mg/kg). Sin embargo, el correspondiente análisis estadístico reveló la ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre el efecto producido por la TMZ y la combinación de lorlatinib y TMZ.

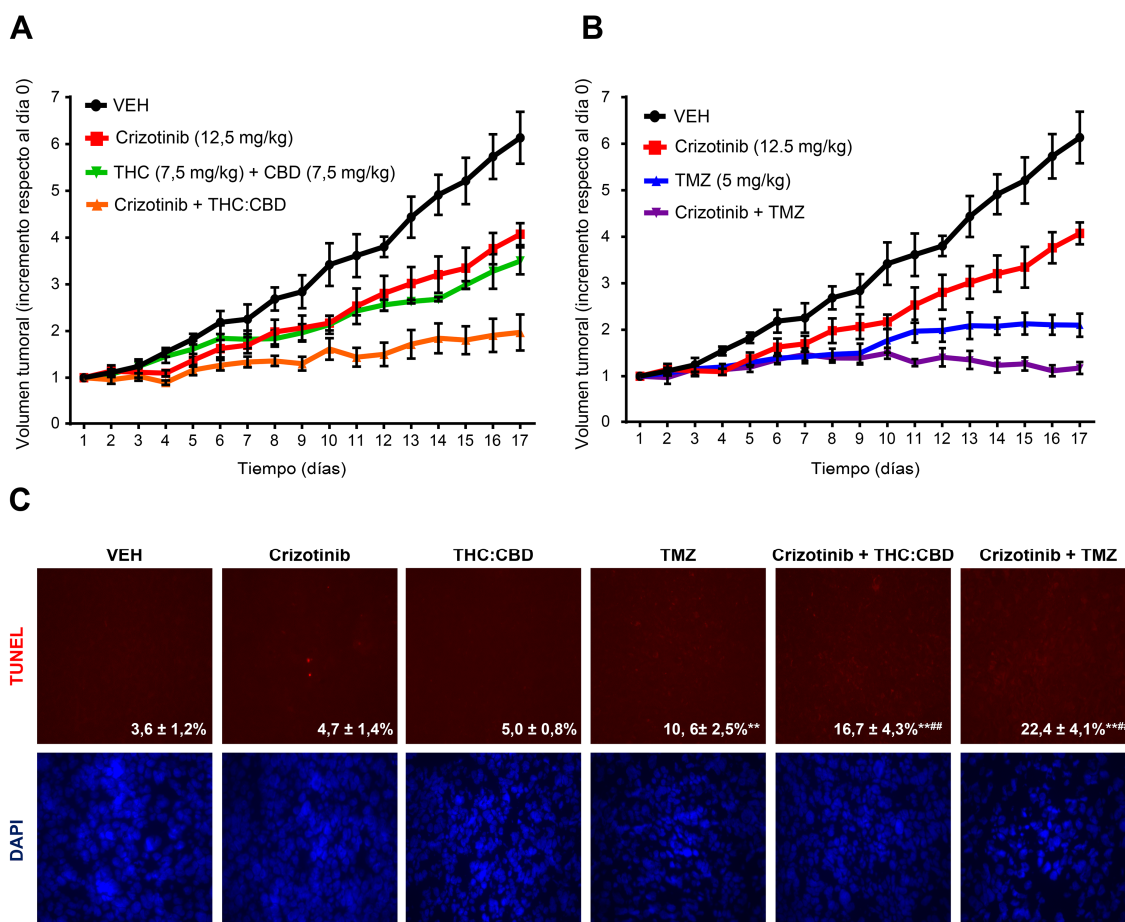


Figura R37. La administración combinada de crizotinib con cannabinoides o TMZ posee un marcado efecto antitumoral en tumores subcutáneos derivados de GICs

(A-B) Efecto del tratamiento oral diario con crizotinib (12,5 mg/kg/día), [THC-BDS (7,5 mg/kg/día) + CBD-BDS (7,5 mg/kg/día), **panel A**] o TMZ (5 mg/kg/2 veces por semana, administración IP, **panel B**) sobre el crecimiento de tumores generados mediante la inyección subcutánea de 2×10^6 células 12012 en el flanco derecho de ratones inmunodeficientes (media \pm SEM; $n=6-7$). Los tumores tratados con crizotinib fueron significativamente diferentes de los tumores tratados con VEH desde el día 10 hasta el final del tratamiento ($P < 0,001$); los tumores tratados con TMZ o con crizotinib + TMZ fueron significativamente diferentes de los tumores tratados con VEH desde el día 8 hasta el final del tratamiento ($P < 0,001$); los tumores tratados con crizotinib + TMZ fueron significativamente diferentes de los tumores tratados solo con crizotinib en el día 11 ($P < 0,01$), y desde el día 12 hasta el final del tratamiento ($P < 0,001$) o solo con TMZ en los días 16 y 17 ($P < 0,05$). Los tumores tratados con crizotinib + THC:CBD fueron significativamente diferentes de los tumores tratados con VEH desde el día 8 hasta el final del tratamiento ($P < 0,001$) de los tumores tratados con crizotinib desde el día 12 al día 14 ($P < 0,01$), y del día 15 hasta el final del tratamiento ($P < 0,001$) así como de los tumores tratados con THC:CBD desde el día 16 hasta el final del tratamiento ($P < 0,01$). **(C)** Efecto de los distintos tratamientos sobre la apoptosis (determinada mediante TUNEL) en muestras derivadas de estos tumores. Se muestran imágenes representativas de los tumores de cada condición experimental. Los valores en la esquina inferior derecha de cada imagen corresponden a porcentaje de células TUNEL positivas en relación con el número total de núcleos (determinado por la tinción DAPI) por campo y se expresan como la media \pm SEM (se analizaron un mínimo de 6 campos de 5 tumores diferentes para cada condición experimental). ** $P < 0,01$ respecto a los tumores tratados con VEH. *** $P < 0,01$ respecto a los tumores tratados con cada uno de los fármacos individualmente.

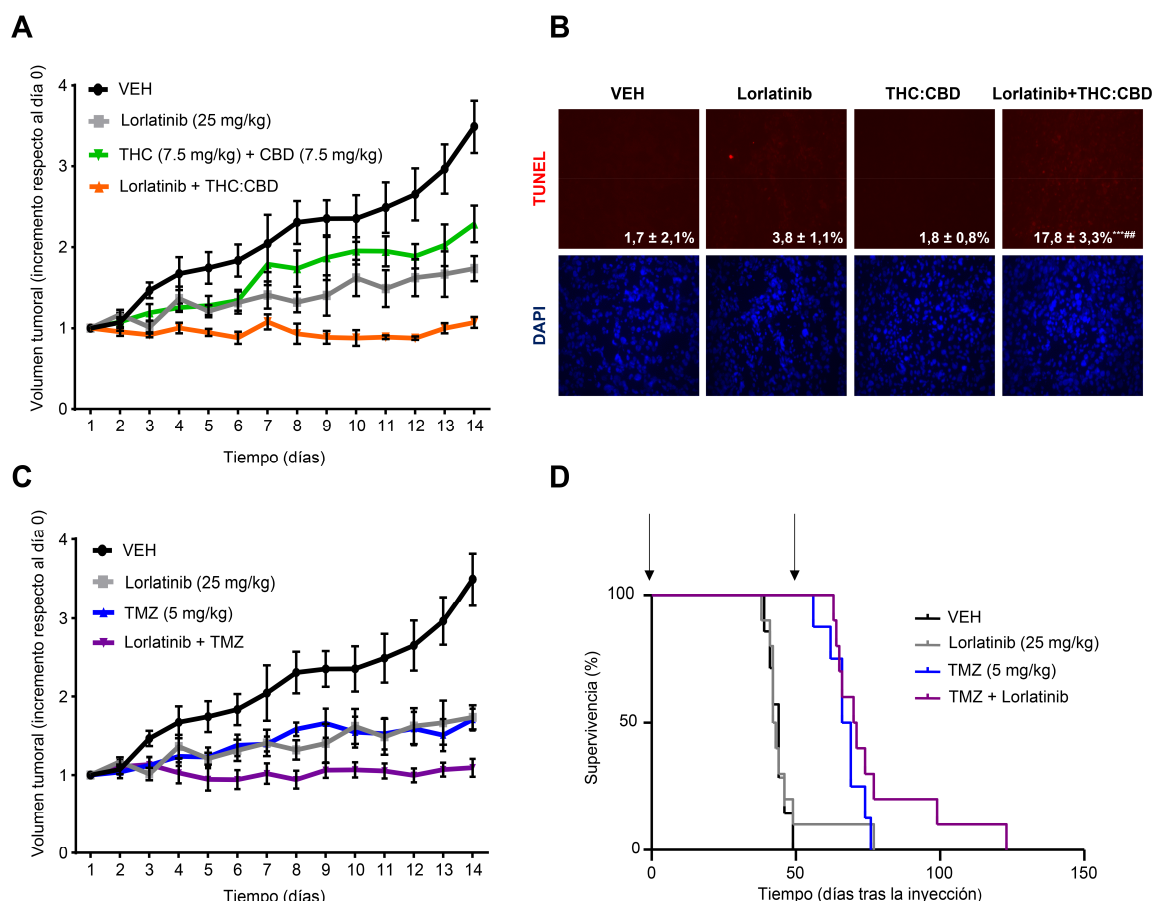


Figura R38. La administración combinada de lorlatinib con cannabinoides o TMZ posee un marcado efecto antitumoral en tumores subcutáneos derivados de GICs

(A-B) Efecto del tratamiento oral diario con lorlatinib (25 mg/kg/día), y THC-BDS (7,5 mg/kg/día) + CBD-BDS (7,5 mg/kg/día) sobre el crecimiento de tumores generados mediante la inyección subcutánea de 2×10^6 células 12012 en el flanco derecho de ratones inmunodeficientes (media \pm SEM; $n=6$, **panel A**) o sobre la apoptosis (determinada mediante TUNEL) en muestras derivadas de estos tumores (**panel B**). **Panel A:** Los tumores tratados con lorlatinib fueron significativamente diferentes de los tumores tratados con VEH desde el día 8 hasta el día 10 ($P < 0,01$), y desde el día 11 hasta el final del tratamiento ($P < 0,001$); los tumores tratados con THC:CBD fueron significativamente diferentes de los tumores tratados con VEH desde el día 14 hasta el final del tratamiento ($P < 0,001$); Los tumores tratados con lorlatinib + THC:CBD fueron significativamente diferentes de los tumores tratados con VEH desde el día 8 hasta el final del tratamiento ($P < 0,001$), de los tumores tratados con lorlatinib en el día 12 ($P < 0,05$) y de los tumores tratados con THC:CBD en el día 8 ($P < 0,05$), día 9 ($P < 0,01$) y desde el día 10 hasta el final del tratamiento ($P < 0,001$). **Panel B:** Se muestran imágenes representativas de cada condición experimental, que incluyen el porcentaje de células TUNEL positivas en relación con el número total de núcleos por campo (media \pm SEM). Se analizaron un mínimo de 6 campos de 5 tumores diferentes para cada condición experimental. ** $P < 0,01$ respecto a los tumores tratados con VEH. ## $P < 0,01$ respecto a los tumores tratados con cada uno de los fármacos individualmente. **(C)** Efecto del tratamiento oral diario con lorlatinib (25 mg/kg/día) y TMZ (5 mg/kg/2 veces por semana, administración IP) sobre el crecimiento de estos tumores subcutáneos. Los tumores tratados con TMZ fueron significativamente diferentes de los tumores tratados con VEH desde el día 11 hasta el final del tratamiento ($p < 0,001$); los tumores tratados con lorlatinib + TMZ fueron significativamente diferentes de los tumores tratados con VEH a día 5 y 6 ($P < 0,05$) y desde el día 7 hasta el final del tratamiento ($P < 0,001$). **(D)** Efecto del tratamiento con lorlatinib (25 mg/kg/día) y TMZ (5 mg/kg, administración IP) sobre el crecimiento de tumores intracraneales generados mediante la inyección de $7,5 \times 10^4$ células 12012 en el estriado de ratones inmunodeficientes ($n=10$). Las flechas situadas sobre la gráfica de supervivencia de Kaplan-Meier representan el momento de inicio y final de los tratamientos (el lorlatinib se administró de forma diaria durante las 3 primeras semanas y en días alternos las 2 semanas siguientes; la TMZ 2 veces por semana durante todo el experimento). $P=0,102$ (Log-rank test Lorlatinib + TMZ vs TMZ).

RESULTADOS

Todos estos resultados demuestran que la utilización de inhibidores de la actividad tirosina-quinasa de ALK en combinación con otros agentes antitumorales como la TMZ y los cannabinoides podría constituir una herramienta terapéutica útil en modelos preclínicos de glioma. En resumen, por tanto, la combinación de inhibidores del eje MDK/ALK con cannabinoides y TMZ podría ser explotada terapéuticamente para el tratamiento del GBM.

DISCUSIÓN

Los estudios llevados a cabo en los últimos años han permitido la identificación de una subpoblación de células con características semejantes a las de las células madre y a las que se denomina "células iniciadoras tumorales" o CICs en la práctica totalidad de los tipos de cáncer que se conocen y que parece ser responsable de su generación y progresión. En el caso del GBM, la elevada resistencia a los tratamientos quimioterapéuticos que se utilizan en la actualidad para luchar contra este tipo de tumores, así como el alto porcentaje de pacientes que sufren recidivas (y que convierten a este tipo de tumores en uno de los más agresivos que existen) parece estar íntimamente ligada a la presencia de las GICs. Debido a sus características intrínsecas de auto-renovación, plasticidad y quiescencia, las GICs contribuyen a la heterogeneidad tumoral característica del GBM, que contiene células con diferentes grados de diferenciación, lo que dificulta el desarrollo de un abordaje terapéutico efectivo capaz de actuar sobre todas las células presentes en el tumor. De esta forma, la erradicación de las GICs parece constituir una etapa crucial para el desarrollo de una terapia que incremente de forma significativa la esperanza de vida media de los pacientes con GBM.

La identificación de los factores de crecimiento y mecanismos moleculares que regulan la supervivencia y el mantenimiento de las GICs podría ayudar a conocer más en profundidad su fisiología y por tanto actuar de una manera más eficaz frente a ellas. Se ha descrito que diversos factores de crecimiento con capacidad transformante como TGF β , VEGF, Wnt o HGF desempeñan un papel relevante en el mantenimiento de las propiedades *stem-like* y la capacidad tumorigénica de las GICs (Hamerlik et al., 2012; Ikushima et al., 2009; Joo et al., 2012). Sin embargo, estas rutas de señalización son también críticas para el mantenimiento de la fisiología normal de células y progenitores neurales adultos no transformados, por lo que la identificación de mecanismos específicos de regulación de las GICs podría tener un gran interés diagnóstico y terapéutico.

Papel del eje MDK/ALK en la regulación de las propiedades *stem-like* de las GICs

En relación con esa idea, los resultados recogidos en esta tesis ponen de manifiesto que el factor neurotrófico MDK estimula la auto-renovación y la capacidad tumorigénica de las GICs, contribuyendo decisivamente al mantenimiento de esta población celular dentro del tumor. De esta forma, la correlación existente entre altos niveles de MDK y peor pronóstico de pacientes con GBM observada en diferentes bases de datos puede deberse, al menos en parte, a la capacidad de este factor de crecimiento para mantener y expandir la población de GICs presente en el tumor. Hasta el momento, numerosas evidencias han sugerido que la MDK contribuye a la progresión de distintos tipos de tumores, incluidos los gliomas, mediante la inhibición de la apoptosis, la estimulación de la angiogénesis, la invasión y la metástasis (Tong et al., 2007; Zhao G et al., 2012; Olmeda et al., 2017). Sin embargo, este trabajo muestra por primera vez que la MDK desempeña un papel oncogénico en GBM al promover la proliferación, auto-renovación y capacidad tumorigénica de distintos cultivos enriquecidos en GICs. Estos datos son consistentes con los publicados recientemente en los que el descenso en los niveles de MDK reduce la capacidad proliferativa de células iniciadoras de cáncer de

próstata (Erdogan et al., 2017; Erdogan et al., 2018). Por otro lado, hay que destacar que la inhibición de la señalización dependiente de MDK tiene unos efectos funcionales muy similares en los distintos cultivos de GICs, independientemente de las alteraciones moleculares presentes en cada uno de ellos. Estos datos apuntan a que este factor neurotrófico es muy relevante para mantener la población de células progenitoras dentro del tumor, las cuales parecen ser altamente dependientes de la señalización por este factor de crecimiento, que contribuye así, de manera similar a otros mediadores (Cleary et al., 2014) a la heterogeneidad característica del GBM.

El incremento en los niveles proteicos de MDK en el medio procedente de GICs en comparación con los de sus correspondientes células diferenciadas sugiere que la MDK estaría actuando sobre las GICs de forma autocrina. Sin embargo, y al igual que ocurre con otros factores de crecimiento, la MDK puede favorecer la progresión tumoral de forma paracrina. Estudios publicados recientemente han demostrado que la MDK regula la proliferación de células endoteliales linfáticas de una manera paracrina promoviendo la metástasis de células de melanoma (Olmeda et al., 2017). Además, no hay que descartar que una parte significativa de los efectos oncogénicos exhibidos por este factor de crecimiento en glioma se deban a su capacidad para interactuar con el nicho tumoral. Así, el tumor puede secretar MDK y de esta manera reducir la capacidad de células del sistema inmune para reconocer a la célula tumoral (Sorrelle et al., 2017). Del mismo modo, la MDK inhibe el efecto citotóxico ejercido por los linfocitos NK (*Natural Killer*) sobre células de cáncer gástrico al promover la endocitosis y posterior degradación del inmunoreceptor NKG2D (Zhao S et al., 2012), favoreciendo el escape a la respuesta inmunológica antitumoral. Del mismo modo, distintas células del estroma como los fibroblastos asociados al tumor pueden secretar elevadas cantidades de MDK, estimulando la expresión de genes pertenecientes a la familia *ABC* como *ABCC1-2* (*ATP-binding cassette subfamily C member 1-2*) que contribuyen a la resistencia a agentes quimioterapéuticos como el cisplatino en carcinoma oral escamoso así como en células tumorales de ovario y pulmón (Zhang et al., 2017). Asimismo, en el contexto de la posible inter-relación entre inflamación y cáncer, altos niveles de expresión de MDK se han correlacionado con un incremento en los niveles de expresión de diversas proteínas pro-inflamatorias del nicho tumoral (Olmeda et al., 2017) así como con el reclutamiento de células del sistema inmune a regiones en las que se ha producido un daño o lesión (Weckbach et al., 2014). Nuevos experimentos destinados a identificar con mayor precisión qué células dentro del estroma se encargan de la producción de MDK y qué consecuencias tiene esta liberación en el nicho tumoral son necesarios para poder comprender mejor la señalización dependiente de este factor de crecimiento y diseñar estrategias terapéuticas más selectivas frente a su acción pro-tumoral.

Además, nuestros datos preliminares utilizando el modelo transgénico murino TVA también sugieren que la MDK podría favorecer la gliomagénesis, siendo relevante en el origen, iniciación y desarrollo de gliomas. Al igual que ocurre con otros factores implicados en el

crecimiento y progresión tumoral como FGF, IGF-1/2 (*insulin-like growth factor 1*), IGFBP2 (*insulin-like growth factor binding protein 2*) o HGF (*hepatocyte growth factor*) (Holland & Varmus, 1998; Rao et al., 2004; Dunlap et al., 2007; Binning et al., 2008), la sobre-expresión de MDK por sí misma no es suficiente para inducir el desarrollo de tumores cerebrales en este modelo. Sin embargo, sí es capaz de favorecer el desarrollo de oligodendrogliomas a partir de progenitores neurales en cooperación con otras alteraciones moleculares como la sobre-expresión de PDGFB, cuya señalización aberrante es un evento temprano en el desarrollo del glioma (Brennan et al., 2013). De este modo, y a pesar de la baja penetrancia de tumores generados, tan solo un evento oncogénico adicional como la sobre-expresión de PDGFB parece ser necesario para que la MDK estimule el desarrollo y progresión de oligodendrogliomas, reforzando así su papel en la iniciación tumoral.

Los resultados obtenidos con MDK en el modelo TVA son similares a los publicados con la PTN, otro factor neurotrófico perteneciente a la misma familia que la MDK y que también posee un papel pro-oncogénico en distintos tipos de tumores como el GBM, al menos en parte, mediante la estimulación de la angiogénesis (Zhang L et al., 2015). Así, la sobre-expresión de PTN en un modelo GFAP-TVA y un fondo genético *Arf*^{-/-} (en el que la inducción tumoral se acelera en comparación con un fondo genético no mutado) (Tchougounova et al., 2007) incrementa la incidencia de generación de oligodendrogliomas de grado II-III tras la sobre-expresión de PDGFB, pero no modifica sus características histológicas. El análisis detallado de estos tumores reveló que la sobre-expresión de PTN potencia la angiogénesis y el desarrollo de una vasculatura anormal en los oligodendrogliomas de alto grado generados (grado III), pero no en los de bajo grado (grado II) (Zhang et al., 2015). De esta forma, conocido el papel desempeñado por la MDK en la angiogénesis (Dai et al., 2007; Weckbach et al., 2012; Huang et al., 2015), cabe hipotetizar que además de estimular la transformación maligna de progenitores neurales, la MDK podría favorecer la generación del glioma, al menos en parte, promoviendo una mayor vascularización. Nuevos experimentos con este modelo encaminados a generar tumores de alto grado deben realizarse para confirmar este hecho. En este sentido, y en línea con publicaciones recientes (Ozawa et al. 2014), nuestros experimentos preliminares muestran que la sobre-expresión simultánea de PDGFB y un *shRNA* específico frente a *p53* genera tumores con características histológicas similares al GBM humano en ratones *Nestina-Tva* tan solo un mes después de la inyección de las células DF-1 (datos no mostrados). El cruce de estos ratones con animales deficientes en MDK podría constituir una estrategia adicional para corroborar el papel de este factor neurotrófico en la gliomagenesis y la participación del microambiente tumoral en dicho proceso.

Se ha descrito que múltiples receptores pueden mediar las distintas funciones biológicas ejercidas por la MDK. En especial, la activación de LRP1, PTPRZ y ALK se ha asociado a los efectos pro-tumorales exhibidos por este factor de crecimiento (Ueoka et al., 2000). Estudios llevados a cabo previamente por nuestro grupo de investigación han

demostrado que ALK es el receptor responsable de mediar la resistencia inducida por MDK a la acción antitumoral de los cannabinoides en líneas celulares de glioma (Lorente et al., 2011). Los datos recogidos en esta tesis muestran que, al igual que se ha descrito en otros trabajos publicados, los niveles de ALK se encuentran altamente expresados en distintos cultivos de GICs (Dirks et al., 2002; Koyama-Nasu et al., 2014). Además, observamos que los efectos ejercidos por la inhibición de ALK mimetizan en gran parte aquellos exhibidos por el bloqueo de la acción de la MDK. Este hecho, junto a los experimentos en los que se muestran cambios de los niveles de fosforilación de ALK y de sus principales dianas de regulación tras la incubación con MDK e inhibidores específicos de ALK, refuerzan la idea de que la acción pro-tumoral ejercida por la secreción autocrina de MDK en GICs recae fundamentalmente en la activación de ALK. En todo caso no se puede descartar que otros receptores, entre ellos LRP1, que se ha asociado al efecto pro-inflamatorio y pro-oncogénico derivado de la secreción de MDK por parte de las células del estroma (Sorrelle et al., 2017), puedan participar en estos efectos.

De esta manera, nuestros resultados ponen de relieve la importancia que el eje MDK/ALK posee sobre el mantenimiento y la expansión de GICs tanto *in vitro* como *in vivo*. Estos resultados se encuentran en línea con publicaciones realizadas recientemente en las que la PTN, que también es un ligando de ALK, estimula la auto-renovación y la capacidad tumorigénica de GICs (Koyama-Nasu et al., 2014) a través de la estimulación de este receptor. Hay que destacar que todos los cultivos de GICs utilizados en el citado trabajo presentan características moleculares que permiten clasificarlos dentro del subtipo proneural de GBM. Por otro lado, el estudio detallado de las bases de datos públicas que se incluyen en esta tesis revela que, si estratificamos a los pacientes con GBM en función a los distintos subtipos descritos para este tipo de tumores, tan solo existe una correlación positiva entre altos niveles de MDK y menor supervivencia en aquellos pacientes pertenecientes al subtipo proneural (**Figura D1**). Estos datos sugieren que factores de crecimiento asociados a heparina como MDK y PTN (y potencialmente su receptor ALK) podrían ser especialmente relevantes en algunos subtipos de GBM como el proneural, promoviendo la expansión de la población de GICs presente en este tipo de tumores. La confirmación de esta hipótesis requiere de una caracterización y clasificación molecular más detallada y precisa de los cultivos de GICs en estudio.

A diferencia de lo que ocurre en otros tipos de tumores como el neuroblastoma o el cáncer de pulmón, el papel oncogénico de ALK en GBM no puede explicarse por la presencia de mutaciones o por la generación de proteínas de fusión que ocasionan la activación constitutiva del receptor (Hallberg & Palmer, 2013). En línea con esta idea, el análisis de distintas líneas celulares y cultivos de GICs como GH2 (utilizada en muchos de nuestros estudios) muestra una ausencia de mutaciones o alteraciones en el dominio tirosina-quinasa de este receptor. Estos resultados apoyan la idea de que la sobre-activación de ALK tras la

unión de un ligando extracelular como la MDK parece ser un mecanismo importante para la supervivencia de GICs, contribuyendo de esta manera a la progresión del GBM.

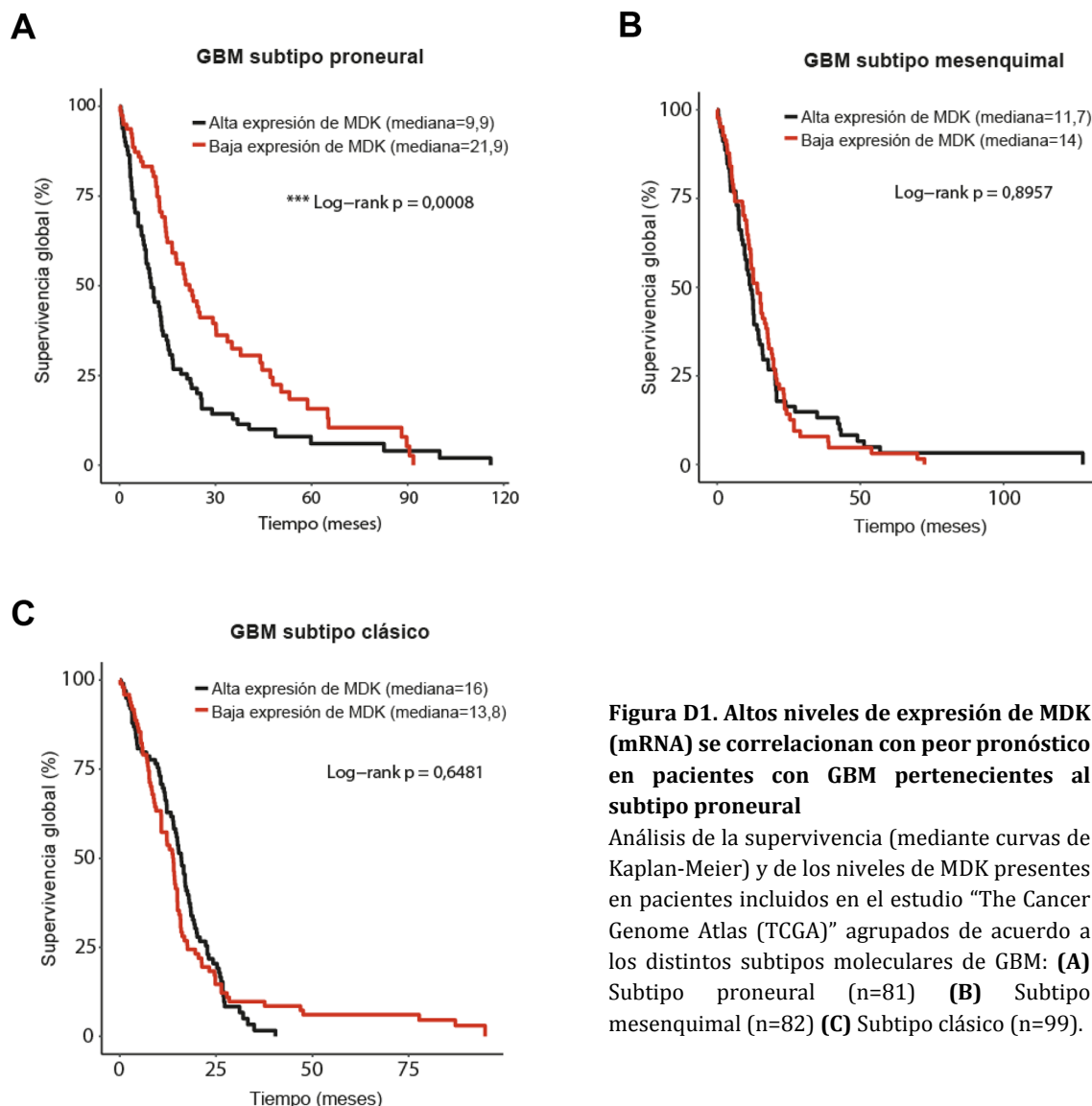


Figura D1. Altos niveles de expresión de MDK (mRNA) se correlacionan con peor pronóstico en pacientes con GBM pertenecientes al subtipo proneural

Análisis de la supervivencia (mediante curvas de Kaplan-Meier) y de los niveles de MDK presentes en pacientes incluidos en el estudio "The Cancer Genome Atlas (TCGA)" agrupados de acuerdo a los distintos subtipos moleculares de GBM: **(A)** Subtipo proneural (n=81) **(B)** Subtipo mesenquimal (n=82) **(C)** Subtipo clásico (n=99).

Sin embargo, numerosos elementos quedan aún por conocer en la interacción entre MDK y ALK. Entre ellos, destacan: (i) determinar si la activación de ALK por parte de MDK se produce de forma directa, o indirecta mediante la participación de receptores como PTPRZ (Perez-Pinera et al., 2007), que también presenta unos niveles incrementados de expresión en células GH2 en comparación con líneas celulares de glioma (datos no mostrados); (ii) estudiar las consecuencias funcionales de la unión de MDK a glicosaminoglicanos en cultivos de GICs (fundamentalmente heparán y condroitín sulfatos) presentes en la matriz extracelular, ya que se ha descrito que podrían alterar la interacción con distintos receptores, modificando así su actividad biológica (Ueoka et al., 2000; Umehara et al., 2004; Kobayashi et al., 2013).

Mecanismos de señalización intracelular regulados por el eje MDK/ALK en GICs

En nuestro ánimo por conocer en profundidad los mecanismos moleculares mediante los cuales el eje MDK/ALK regula la biología de las GICs, hemos descubierto que este eje tiene como principal diana el control de la estabilidad del factor de transcripción SOX9 (**Figura D2**). Como en este mismo trabajo se muestra, y distintos grupos de investigación han descrito con anterioridad, SOX9 contribuye decisivamente a mantener la capacidad de auto-renovación, invasión y generación de tumores de las GICs (Swartling et al., 2012; Liu et al., 2015; Hiraoka et al., 2015). De esta forma, el bloqueo del eje MDK/ALK induce una activación de la autofagia que es responsable de la degradación del factor de transcripción SOX9, lo que constituye un evento temprano capaz de inducir una reprogramación celular que conduce a la pérdida de las propiedades características de las GICs.

Numerosas pruebas han demostrado que la autofagia posee una especial relevancia durante periodos de quiescencia y diferenciación, siendo un mecanismo celular crucial para la preservación de la homeostasis y las propiedades *stem-like* de células madre no tumorales (Zhou et al., 2009; Guan et al., 2013; García-Prat et al., 2016). Dada la similitud entre las células iniciadoras de tumores y las células *stem* no transformadas, cabría pensar que la autofagia desempeña también un papel citoprotector en las CSCs. En línea con esta idea, el tratamiento con inhibidores de la autofagia como la cloroquina (Choi et al., 2014), o el silenciamiento de genes esenciales de la maquinaria autofágica como *BECLIN-1* y *ATG8/LC3* (Gong et al., 2013; Cuffi et al., 2011) o *DRAM1* y *p62* (Galavotti et al., 2013), es esencial para la supervivencia, migración e invasión de células iniciadoras de tumores aisladas en cáncer de mama y GBM respectivamente. Por el contrario, y en concordancia con nuestras observaciones, la activación de la autofagia también se ha asociado a la diferenciación y la pérdida de la capacidad de auto-renovación de las GICs. Así, el tratamiento con rapamicina, un inhibidor de la actividad de MTORC1, activa la autofagia e induce la diferenciación de GICs, disminuyendo su capacidad para generar tumores y sensibilizándolas al tratamiento con radiación ionizante (Tao et al., 2018; Zhuang et al., 2011). La estimulación de la autofagia también favorece la diferenciación y la pérdida de las propiedades *stem-like* y tumorigénicas de células iniciadoras de tumores aisladas de pacientes con cáncer de colon (Francipane & Lagasse, 2013). Asimismo, la inhibición genética o farmacológica de la autofagia impide la diferenciación de cultivos enriquecidos en células *stem* de neuroblastoma y GBM (Zeng & Zhou, 2008; Zhao et al., 2010).

Merece la pena destacar que, aunque la inhibición del eje MDK/ALK promueve una autofagia que estimula la pérdida del fenotipo *stem-like*, el silenciamiento de la autofagia en condiciones basales no posee efectos significativos sobre la capacidad de auto-renovación de las GICs, a diferencia de lo observado por otros grupos de investigación (Galluzzi et al., 2015).

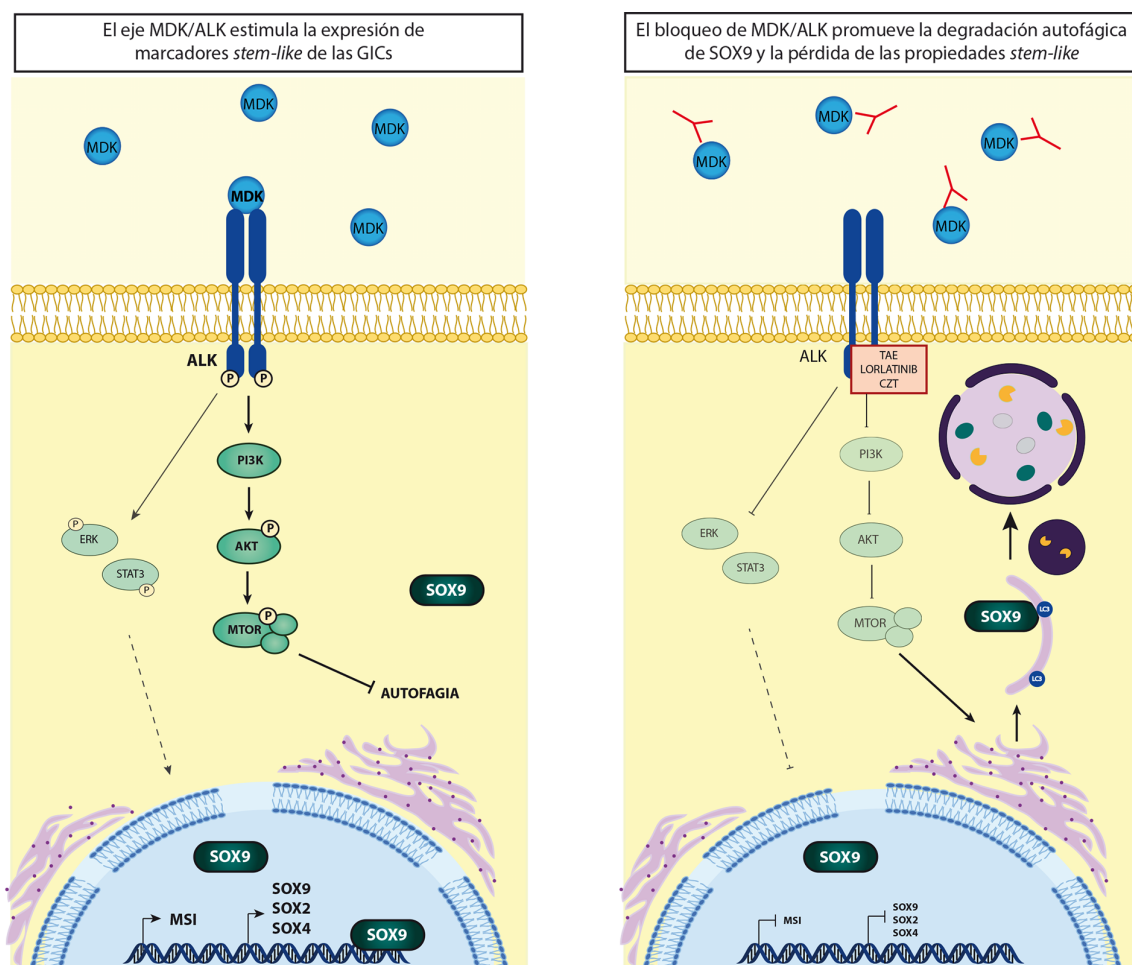


Figura D2. Representación esquemática de los mecanismos de regulación ejercidos por la señalización dependiente del eje MDK/ALK en GICs

El factor de crecimiento MDK estimula la activación del receptor ALK, lo que conduce a la activación de las vías de señalización AKT/STAT3/ERK y con ello al mantenimiento del fenotipo "stem-like" mediante el control de la expresión de genes característicos de células progenitoras neurales como MSI o distintos miembros de la familia SOX. Por el contrario, el bloqueo del eje MDK/ALK utilizando distintas aproximaciones genéticas y farmacológicas (entre las que se encuentran el uso de anticuerpos neutralizantes de MDK e inhibidores de la actividad tirosina-quinasa de ALK) induce una estimulación de la autofagia que promueve la degradación de SOX9. Este evento molecular induce una disminución posterior y progresiva en los niveles de expresión de otros marcadores de células progenitoras neurales, que en último término conlleva una pérdida de las propiedades *stem-like* y una disminución de la capacidad tumorigénica de estas células.

Con estos datos, la pregunta que surge inmediatamente después es cómo la autofagia puede ejercer funciones tan opuestas en estas células iniciadoras de tumores, al igual que ocurre en el contexto global del cáncer (Singh et al., 2018). Es muy probable que dependiendo del tipo celular, del estímulo inductor de autofagia (así como de la intensidad y duración del mismo en un contexto determinado), o de la etapa en la que se encuentre un tumor, esta autofagia pueda desencadenar una u otra respuesta en la célula. Así, por ejemplo, se ha descrito que cambios en la composición lipídica del autofagosoma (y en particular de la proporción dihidroceramida-ceramida) podrían explicar por qué 2 estímulos distintos como la privación de nutrientes y el tratamiento con THC, promueven una autofagia protectora o citotóxica respectivamente en células de glioma (Hernández-Tiedra et al., 2016).

Otra de las posibles explicaciones a este hecho es que un estímulo (o la ausencia de éste) active una autofagia capaz de degradar proteínas relevantes o esenciales para el mantenimiento de una determinada función en la célula, en este caso, la capacidad de proliferación y auto-renovación de células iniciadoras de tumores. Se ha descrito que la degradación dependiente de autofagia de proteínas inhibidoras de la diferenciación ID1-ID2 induce la diferenciación e inhibe la auto-renovación de células iniciadoras de tumores de neuroblastoma (Li et al., 2017). Asimismo, la degradación autofágica de otras proteínas implicadas en el mantenimiento de las propiedades *stem-like* como NOTCH1 (Ahn et al., 2016; Wu et al., 2016; Tao et al., 2018), la aldehído deshidrogenasa (ALDH1A3) (Wu et al., 2018), proteínas de fusión como PML-RARA (*promyelocytic leukemia/retinoic acid receptor alpha*) (Isakson et al., 2010) así como factores de transcripción como HIF-2 α (Liu et al., 2015) y β -CATENINA (Petherick et al., 2013) reduce la capacidad de auto-renovación de células iniciadoras de tumores aisladas en distintos tipos de neoplasias. De acuerdo a nuestros resultados, un evento similar podría estar ocurriendo con SOX9, en nuestro modelo, tras la inhibición del eje MDK/ALK.

Trabajos publicados con anterioridad han demostrado que distintos mecanismos post-traduccionales regulan los niveles y la actividad de SOX9 en células tumorales, y con ello sus propiedades proliferativas y oncogénicas. Por ejemplo, se ha descrito que el factor de transcripción SLUG estabiliza SOX9 evitando su ubiquitinación y subsecuente degradación en el proteasoma, lo que promueve una mayor capacidad de auto-renovación y metástasis en carcinoma pulmonar (Luanpitpong et al., 2016). Igualmente, alteraciones en la proteína FBW7, que forma parte del complejo E3 ubiquitín-ligasa y que habitualmente se encuentra mutada o ausente en meduloblastoma, impiden la ubiquitinación y posterior degradación de SOX9 en el proteasoma, contribuyendo a la metástasis y a la resistencia a distintos fármacos en este tipo de tumores (Suryo Rahmanto et al., 2016). Además, la fosforilación de SOX9 por la quinasa dependiente de GMP cíclico de tipo II (PKGII) restringe su capacidad para translocarse al núcleo, incrementando los niveles de SOX9 en el citoplasma y disminuyendo así el fenotipo *stem-like* y la proliferación de células de glioma (Swartling et al., 2009).

Sin embargo, ésta es la primera vez en la que se describe que un miembro de la familia SOX puede ser regulado por autofagia. Recientemente, un artículo publicado por el grupo de Ander Matheu ha demostrado que tanto SOX9 como SOX2 son diana del complejo MTORC1 puesto que el tratamiento con rapamicina disminuye los niveles de mRNA y proteína de ambos factores de transcripción en líneas celulares de glioma, sensibilizando estas células al tratamiento con TMZ (Garros-Regulez et al., 2016). Estos datos sugieren que la autofagia podría ser un mecanismo de regulación de los niveles de SOXs en estas células. Aunque en este y otros trabajos se describe que SOX9 podría encontrarse regulado a nivel post-transcripcional por otros miembros de la familia SOX como SOX2 (Hoffmann et al., 2014; Garros-Regulez et al., 2016), nuestros resultados conceden a la degradación de SOX9 dependiente de la inhibición del eje MDK/ALK una especial relevancia como evento temprano

capaz de disparar una modificación de la expresión de distintos genes implicados en el mantenimiento del fenotipo *stem-like*, incluido SOX2. A pesar de la clara relevancia de esta degradación, la reversión parcial del efecto ejercido por la inhibición de MDK sobre las características *stem-like* de GICs después de re-expresar SOX9 sugiere que, como es lógico, el eje MDK/ALK podría estar controlando el fenotipo *stem-like* de estas células mediante otros mecanismos. Este hecho se sustenta además en que la reducción en los niveles de expresión de *BMI1* [un gen importante en el mantenimiento del fenotipo *stem-like*, y cuyos niveles de expresión se encuentran regulados por SOX9 (Matheu et al., 2012)] tras el bloqueo del eje MDK/ALK no es homogénea en todos los cultivos de GICs utilizados en este trabajo. Así, es probable que este tipo de regulación de SOX9 dependiente de la inhibición del eje MDK/ALK sea más relevante en unos contextos que en otros o ante la existencia de determinadas mutaciones.

De esta manera, no hay que descartar que otros sustratos o proteínas oncogénicas estén sujetas a degradación por autofagia tras la inhibición del eje MDK/ALK. En este sentido, cobra especial relevancia la capacidad de la autofagia para degradar estos sustratos de una forma relativamente específica. Este proceso depende fundamentalmente de 2 proteínas implicadas en el mecanismo autofágico: p62, capaz de reclutar proteínas ubiquitinadas al autofagosoma a través de su dominio UBD; o a través de LC3, mediante una interacción directa con secuencias LIR. A diferencia de los ejemplos citados anteriormente, en los que se ha descrito que p62 interacciona con proteínas implicadas en el mantenimiento del fenotipo *stem* para ser degradadas en el autofagosoma, experimentos preliminares llevados a cabo en nuestro laboratorio muestran que SOX9 no inmunoprecipita con p62 (datos no mostrados), sugiriendo que esta proteína no está implicada en la degradación de SOX9. De esta forma, cabe la posibilidad de que SOX9 sea degradado mediante su interacción directa con LC3 [(gracias a la presencia de secuencias LIR encontradas en su secuencia aminoacídica, como se ha descrito para otras proteínas como β -CATENINA (Petherick et al., 2013)); o bien formando parte de complejos proteicos integrados por proteínas como la propia β -CATENINA (Bernard & Harley, 2010), que previamente se ha descrito que puede interaccionar con SOX9 en la diferenciación de condrocitos (Akiyama et al., 2004) y que presenta un patrón de expresión similar al exhibido por SOX9 tras la inmunoprecipitación con LC3. En este sentido, la generación de construcciones en las que las secuencias LIR de SOX9 y β -CATENINA se encuentren mutadas podría aportar una información más precisa acerca de los mecanismos moleculares que determinan la degradación de SOX9 por autofagia.

También es reseñable destacar que estudios previos han descrito que tanto la expresión de PTN como de ALK se encuentra regulada por miembros de la familia SOX como SOX2 y SOX4, respectivamente (Koyama-Nasu et al., 2014; Chiba et al., 2017). Sin embargo, los datos de nuestro trabajo sugieren que SOX9 no regula los niveles de expresión de MDK, ya que el silenciamiento o la sobre-expresión de este factor de transcripción no altera los niveles

proteicos de MDK (datos no mostrados), sugiriendo que no existe un bucle autorregulatorio entre SOX9 y MDK.

Desarrollo de terapias preclínicas frente al GBM basadas en la combinación de inhibidores del eje MDK/ALK, cannabinoides y TMZ

Desde el punto de vista preclínico/terapéutico, esta tesis aporta resultados sólidos que apuntan que el eje MDK/ALK podría constituir una diana terapéutica de interés para el tratamiento del GBM. Así, se muestra que el bloqueo farmacológico de MDK (utilizando anticuerpos capaces de eliminar prácticamente toda la MDK soluble presente en el medio) o de ALK (utilizando inhibidores de su actividad tirosina-quinasa que se utilizan actualmente en la práctica clínica) disminuye significativamente el crecimiento de tumores generados con cultivos enriquecidos en GICs. Esta acción parece deberse, al menos en parte, a su capacidad para inhibir la capacidad de auto-renovación de la población de células con características *stem-like* presentes en este tipo de tumores. Además, dado el restringido patrón de expresión de MDK y ALK en el tejido adulto sano, y el hecho de que ratones deficientes para MDK o ALK no presenten alteraciones severas que comprometan su desarrollo y supervivencia (Palmer et al., 2009; Muramatsu, 2014), sugiere que dirigir las terapias frente a este eje podría suponer una estrategia relativamente específica para actuar sobre la progresión tumoral sin causar efectos adversos significativos en órganos o tejidos sanos.

Nuestros datos indican que el tratamiento individual con estos agentes tiene un efecto citostático más que citotóxico, incapaz por tanto de inducir la muerte celular de esta población de GICs tanto *in vitro* como *in vivo*. Estos resultados se encuentran en línea con publicaciones previas, en las que se muestra que la inhibición de la señalización dependiente de factores de crecimiento que contribuyen al mantenimiento de la capacidad proliferativa y tumorigénica de células de glioma, entre ellos la MDK, no conduce a la apoptosis de estas células, sino que las sensibiliza a la acción de otros agentes antitumorales (Erdogan et al., 2017; Erdogan et al., 2018). De este modo, la utilización de estos inhibidores en combinación con fármacos antitumorales convencionales podría ayudar a erradicar estas células y con ello la progresión tumoral.

El tratamiento quimioterapéutico estándar para los pacientes con GBM es el agente alquilante TMZ. Algunos estudios han asociado la resistencia característica de las GICs a este fármaco con unos altos niveles de expresión de la enzima MGMT (Happold et al., 2018). Sin embargo, datos preliminares muestran que esta enzima no se encuentra sobre-expresada en células GH2 y 12012 (a pesar de que estas células también exhiben resistencia a la acción de la TMZ). Este hecho sugiere que otros mecanismos como la activación del eje MDK/ALK podrían estar implicados en la resistencia a la acción antitumoral de la TMZ. En este sentido, nuestros experimentos ponen de relieve que el tratamiento con crizotinib [un inhibidor de ALK y otros receptores con actividad tirosina-quinasa como MET y ROS1 implicados en la proliferación y auto-renovación de GICs (Joo et al., 2012; Junca et al., 2017)] potencia la acción

antitumoral promovida por la TMZ. Estos datos se encuentran en consonancia con publicaciones recientes en las que se muestra que la combinación de CZT y TMZ tiene un efecto más potente que los tratamientos individuales con cada uno de estos compuestos sobre la viabilidad de líneas celulares de glioma que expresan altos niveles de ALK, MET y ROS1 *in vitro* (Das et al., 2015). A pesar de su menor selectividad por ALK en comparación con otros inhibidores, el crizotinib presenta la gran ventaja de encontrarse aprobado por la FDA para el tratamiento de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico, y estudios publicados recientemente demuestran que es un fármaco con un perfil de seguridad y tolerabilidad muy bueno (Blackhall et al., 2017).

En base a todos estos datos, en la actualidad se encuentra en marcha un ensayo clínico en fase Ib de escalada de dosis seguido de una fase de expansión para evaluar la seguridad y actividad antitumoral ejercida por la combinación de crizotinib, TMZ y radioterapia en pacientes con GBM recién diagnosticado (NCT02270034). Se han reclutado un total de 38 pacientes, y atendiendo a la toxicidad limitante de dosis, el perfil de seguridad y la dosis máxima tolerada, se ha establecido que la dosis recomendada de crizotinib para la fase II del ensayo, que se encuentra en estos momentos en desarrollo, sea de 250 mg/día. El análisis de los resultados procedentes de este ensayo clínico (que incluye la valoración de los niveles circulantes de MDK en el suero de los pacientes), podría sentar las bases para futuros ensayos clínicos más amplios, así como para la identificación de pacientes con GBM que potencialmente pudieran beneficiarse en mayor medida de una terapia basada en inhibidores de ALK.

A pesar de la potente acción ejercida por el crizotinib en tumores subcutáneos derivados de GICs, en experimentos piloto desarrollados en nuestro laboratorio el tratamiento de ratones inmunodeficientes con este inhibidor (ya sea de forma individual o en combinación con otros fármacos) no produjo una reducción significativa del crecimiento de tumores intracraneales generados con estas células (**Figura D3**). Como es bien conocido, una de las principales limitaciones para el tratamiento de los tumores cerebrales es la dificultad que poseen la amplia mayoría de fármacos para atravesar la BHE, cuya permeabilidad se encuentra altamente regulada por diversas moléculas e interacciones celulares (Abbott, et al., 2006; Saunders, et al, 2008). Aunque debido a su bajo peso molecular los inhibidores de la actividad tirosina-quinasa pueden atravesar la BHE con mayor facilidad que otros fármacos, el crizotinib ya ha mostrado una eficacia limitada para reducir las metástasis cerebrales que de forma frecuente aparecen en pacientes con NSCLC (Zhang I et al., 2015). Aunque otras razones pueden estar detrás de esta limitada acción, como la presencia de mutaciones secundarias en el receptor (Doebele et al., 2012), Costa y colaboradores demostraron que las concentraciones de este fármaco en suero eran 400 veces más altas que en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con NSCLC tratados con crizotinib (Costa et al., 2011). Ante esta situación, se ha optado en la clínica por incrementar las dosis del fármaco hasta los 500-1000 mg/día [aunque la utilización de estas dosis se han asociado en algunos casos con la aparición

de efectos secundarios tales como bradicardia asintomática [Kim et al., 2013]], así como por utilizar inhibidores de la actividad tirosina-quinasa de ALK de segunda y tercera generación.

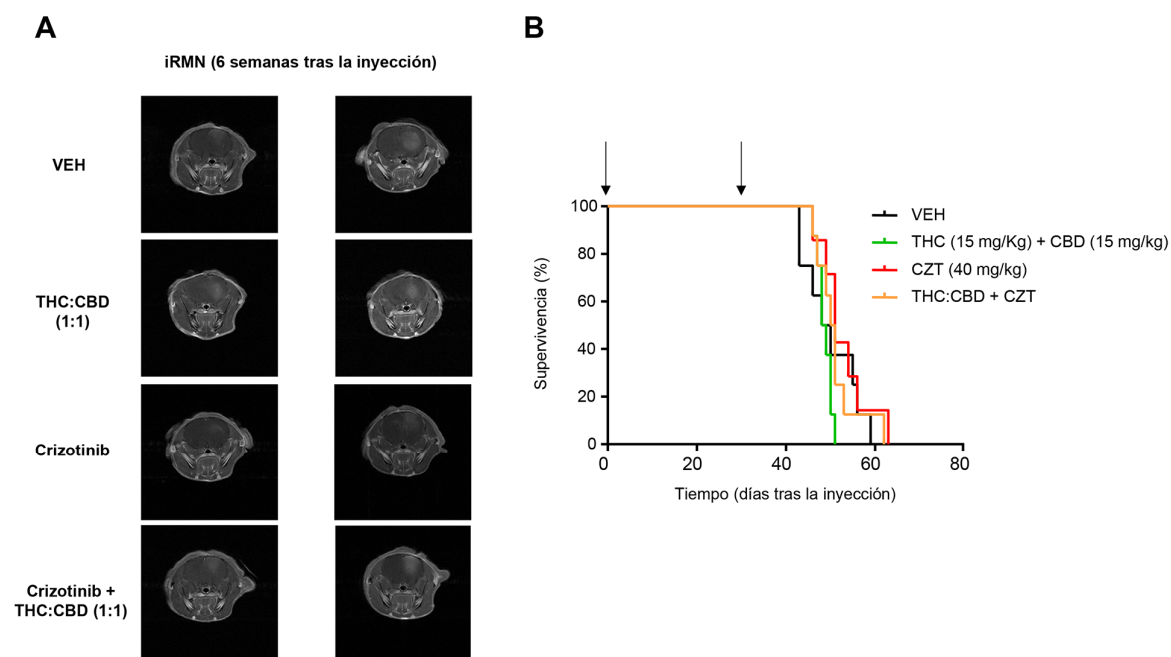


Figura D3. La administración combinada de crizotinib (CZT) y cannabinoides es incapaz de reducir el crecimiento de tumores intracraneales generados con GICs

(A-B) Efecto del tratamiento oral con crizotinib (40 mg/kg) y THC-BDS (15 mg/kg) + CBD-BDS (15 mg/kg) sobre el crecimiento de tumores generados mediante la inyección intracraneal de $7,5 \times 10^4$ células 12012 en el estriado de ratones inmunodeficientes ($n=8$). **(A)** 2 imágenes representativas de RMN para cada condición experimental 6 semanas después de la inyección de los tumores. **(B)** Curva de supervivencia de Kaplan-Meier de los ratones portadores de estos tumores. Las flechas situadas sobre la gráfica de supervivencia representan el momento de inicio y final de los tratamientos (tanto el crizotinib como los cannabinoides se administraron diariamente durante las 2 primeras semanas y en días alternos durante las 2 siguientes semanas).

Estos fármacos poseen modificaciones químicas en su estructura que les permite atravesar con mayor facilidad la BHE, debido fundamentalmente a que muchos de ellos no son sustratos de la glicoproteína P [Zhang I et al., 2015]. Uno de estos inhibidores es el lorlatinib, que además de poseer una mayor selectividad por ALK [Johnson et al., 2014; Yamazaki et al., 2014], ha demostrado una gran eficacia para reducir el crecimiento de tumores intracraneales en modelos preclínicos [Zou et al., 2015a; Zou et al., 2015b]. Su acción antitumoral se está evaluando en diferentes ensayos clínicos en pacientes con NSCLC, neuroblastoma y linfoma anaplásico que presentan alteraciones en ALK o ROS1 (www.clinicaltrials.gov). Los resultados obtenidos en uno de estos ensayos se han hecho públicos recientemente y en ellos se muestra que el lorlatinib presenta una potente acción frente a tumores intracraneales en pacientes con NSCLC-ALK (+) tanto en primera línea como tras la administración previa de otros fármacos como el crizotinib [Solomon et al., 2018]. Estos datos, unidos a nuestros resultados de un experimento piloto en los que la administración conjunta de lorlatinib y TMZ muestra un efecto inhibitorio (aunque estadísticamente no significativo, al menos con el número de animales y dosis empleadas) sobre la progresión de tumores intracraneales generados con

GICs, sugieren que la eficacia antitumoral de esta combinación debe ser explorada en nuevos experimentos. Una primera estrategia a seguir en esos experimentos podría basarse en un incremento de las dosis utilizadas. Adicionalmente, sería conveniente introducir en este tipo de modelos el tratamiento con radioterapia, no solo con la finalidad de reproducir el tratamiento estándar al que se someten los pacientes, sino también porque este tratamiento puede alterar la permeabilidad de la BHE (Van Vulpén et al., 2002; Li et al., 2003) y de este modo modificar el efecto antitumoral ejercido por otras terapias como los inhibidores de la actividad tirosina-quinasa de ALK.

A raíz de nuestros resultados, podemos concluir también que la inhibición del eje MDK/ALK sensibiliza las GICs a la acción antitumoral no solo de la TMZ, sino de otros agentes como los cannabinoides (**Figura D4**).

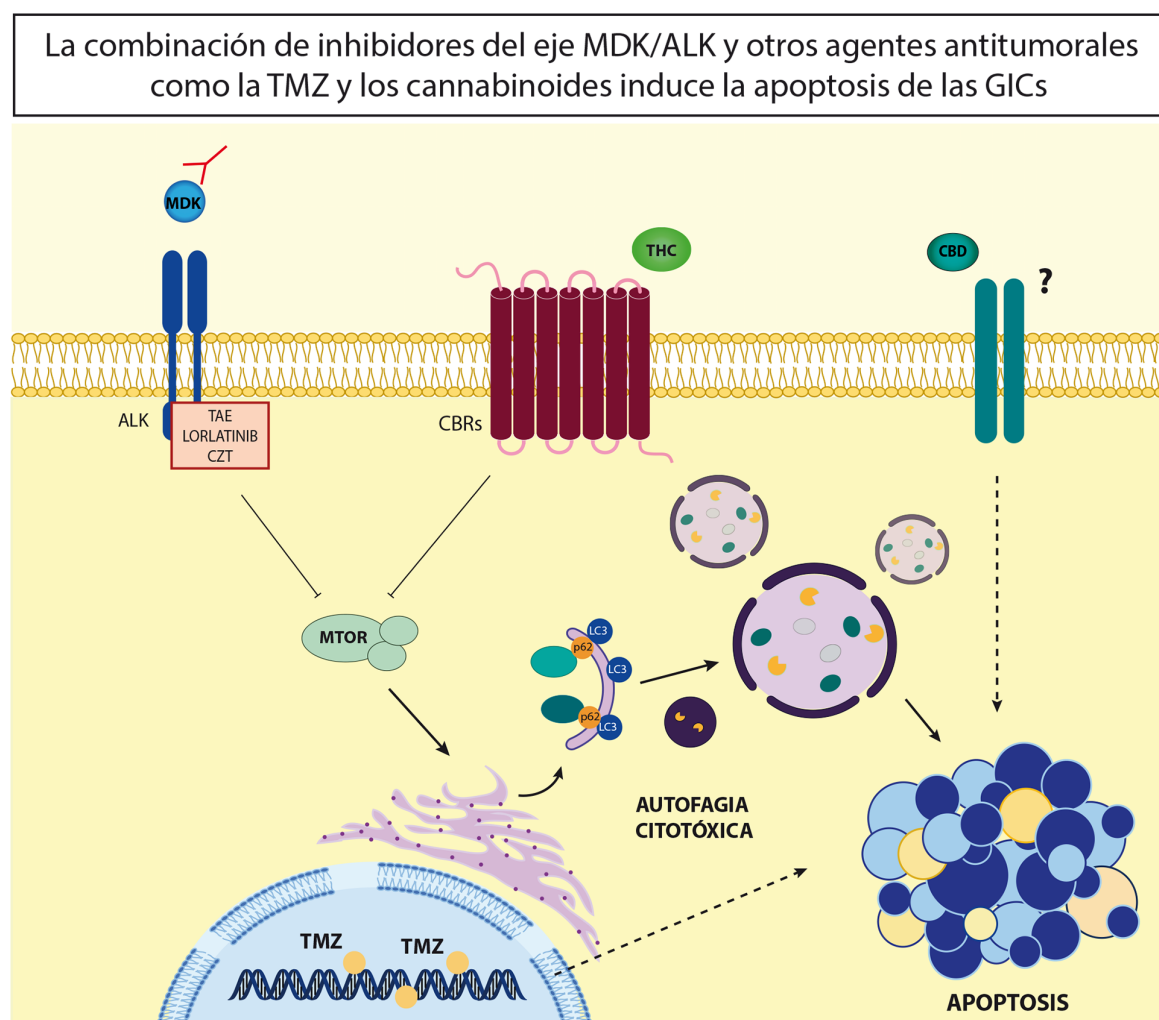


Figura D4. Representación esquemática de los mecanismos de señalización intracelular promovidos por el tratamiento de GICs con inhibidores del eje MDK/ALK en combinación con cannabinoides y TMZ

La administración combinada de anticuerpos neutralizantes de MDK o inhibidores de la actividad tirosina-quinasa de ALK con cannabinoides induce la muerte celular de las GICs. Este hecho es en gran parte dependiente de la estimulación sinérgica y prolongada de una respuesta autofágica que conduce a la apoptosis de estas células. Del mismo, los inhibidores del eje MDK/ALK en combinación con TMZ promueven la apoptosis de GICs mediante mecanismos aún no identificados.

Además de su acción paliativa en pacientes con cáncer, numerosos estudios realizados en modelos animales (Marcu et al., 2010; Torres et al., 2011; López-Valero et al., 2018a), así como los datos procedentes de varios ensayos clínicos (www.clinicaltrials.gov números de identificación NCT01812603 y NCT01812616), han aportado evidencias sólidas acerca del efecto antitumoral exhibido por los cannabinoides en GBM. Las observaciones recogidas en esta tesis apoyan firmemente la idea de que estos compuestos (ya sea en combinación con inhibidores del eje MDK/ALK o en combinación con TMZ) pueden ser unos excelentes candidatos para el tratamiento del GBM al actuar de forma efectiva frente a la población de GICs, altamente resistente a su acción tanto *in vitro* como *in vivo*.

a) Potencial terapéutico de la combinación de inhibidores del eje MDK/ALK y cannabinoides: anticuerpos neutralizantes de MDK

Como ya se ha descrito con anterioridad, altos niveles de MDK promueven resistencia a la acción antitumoral del THC a través de la estimulación de ALK, impidiendo la activación de una autofagia citotóxica promovida por estos compuestos en células diferenciadas de glioma. De este modo, el silenciamiento genético de MDK o farmacológico de ALK hace que estas células sean más sensibles a la acción antitumoral del THC (Lorente et al., 2011). Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral demuestran que tanto los inhibidores de MDK/ALK como los cannabinoides inducen autofagia en GICs, aunque solo la combinación de los dos tipos de compuestos es capaz de estimular una autofagia pro-apoptótica en estas células. El hecho de que la neutralización de MDK incremente los niveles de expresión de genes de estrés de RE como *p8* y *TRIB3* [y lo que es más relevante, potencie su inducción tras tratamiento con cannabinoides en GICs (datos no publicados)] sugiere que el eje MDK/ALK estaría promoviendo una señalización pro-supervivencia capaz de frenar la autofagia citotóxica de los cannabinoides similar a la ya descrita en células diferenciadas.

Otra posible explicación al efecto combinado observado por ambos compuestos es que la pérdida de fenotipo *stem-like* inducida por los inhibidores del eje MDK/ALK pueda sensibilizar estas células a la apoptosis promovida por los cannabinoides. Una de las estrategias terapéuticas más utilizadas para actuar sobre la población de células iniciadoras de tumores se basa precisamente en la administración de fármacos que estimulen su diferenciación, incrementando así su susceptibilidad al tratamiento con otros agentes citotóxicos (Zhuang et al., 2011; Nabissi et al., 2015; Spinello et al., 2018). Aunque el tratamiento con inhibidores del eje MDK/ALK induzca una pérdida del fenotipo *stem-like* en nuestras poblaciones de GICs, no encontramos un incremento consistente en la expresión de marcadores de diferenciación terminal como GFAP (*glial fibrillar acid protein*) o β -III tubulina (datos no mostrados). Los experimentos de citometría de flujo sugieren que la apoptosis ocurre en la población de células que expresan marcadores *stem* como CD133, y que por tanto el efecto del tratamiento combinado no tiene por qué basarse en una diferenciación previa de las GICs. En cualquier caso, no podemos afirmar que la apoptosis sea específica de este tipo de células, ya que la eliminación completa del cultivo heterogéneo en estudio implica la

eliminación o apoptosis tanto de la población con un fenotipo *stem-like* como de la más diferenciada, con lo que cabría pensar que las células diferenciadas sufren apoptosis con anterioridad. En línea con esta idea, estudios publicados previamente por nuestro grupo de investigación han demostrado que el silenciamiento de MDK o de ALK favorece la activación de la apoptosis característica de los cannabinoides en células de glioma diferenciadas. Más experimentos serían necesarios para poder identificar si los mecanismos celulares observados (autofagia, diferenciación y apoptosis) ocurren de forma simultánea o secuencial en las distintas subpoblaciones celulares presentes en nuestros cultivos.

Aunque una parte considerable de nuestro trabajo preclínico se ha centrado en la utilización de inhibidores de la actividad tirosina-quinasa de ALK debido a las ventajas que presentan frente a la utilización de otras estrategias, la inhibición farmacológica de MDK, mediante el uso de anticuerpos neutralizantes, también podría ser explotada desde el punto de vista terapéutico. Nuestros resultados revelan que la combinación de anticuerpos monoclonales murinos neutralizantes de la MDK humana y cannabinoides posee un potente efecto antitumoral en tumores subcutáneos generados con GICs. Estos anticuerpos ya han sido utilizados de forma preclínica en diferentes patologías. Así, el tratamiento intraperitoneal de ratones SCID con anticuerpos neutralizantes de MDK reduce significativamente tanto el crecimiento de tumores subcutáneos generados con líneas celulares de osteosarcoma como las metástasis pulmonares generadas por este tipo de células (Sueyoshi et al., 2012). Además, estos anticuerpos, utilizando las mismas pautas de administración que en nuestros experimentos *in vivo*, promueven la regeneración ósea de ratones C57BL/6J, reduciendo significativamente sus niveles circulantes de MDK (Haffner-Luntzer et al., 2016). De acuerdo a los resultados presentados en esta Tesis, especial relevancia parecen poseer aquellos anticuerpos dirigidos frente a epítomos localizados en la región N terminal de la molécula de MDK, implicada en la dimerización necesaria para su actividad biológica. La gran mayoría de anticuerpos neutralizantes y de moléculas inhibitoras de MDK de bajo peso molecular diseñados hasta la fecha estaban dirigidas frente al dominio C terminal de la proteína (Matsui et al., 2010), considerado responsable de su actividad biológica (Muramatsu, 2014; Dianat et al., 2015). Sin embargo, datos patentados por la empresa farmacéutica CellMid (número de patente US9624294B2) también indican que anticuerpos dirigidos frente a la región N terminal de MDK inhiben la migración de células de osteosarcoma de rata de una forma significativamente más eficiente que anticuerpos dirigidos frente a la región C terminal de esta proteína. Estas observaciones favorecen por tanto el uso de anticuerpos neutralizantes de MDK diseñados frente a epítomos localizados en su extremo N terminal en glioma y aportan información estructural relevante acerca de la función de esta región de la proteína. Así, el bloqueo del extremo N terminal podría inhibir su actividad biológica independientemente del receptor o receptores que estén mediando la acción de la MDK.

Sin embargo, a pesar de estos resultados prometedores, el elevado peso molecular de los anticuerpos constituye un problema adicional al de otras moléculas para atravesar la BHE,

que podría ser responsable del fracaso de este tipo de terapias en GBM (Chacko et al., 2013). Por tanto, es necesario desarrollar experimentos adicionales encaminados a evaluar la capacidad de los anticuerpos anti-MDK (preferentemente humanizados, para disminuir la posible aparición de respuestas inmunogénicas adversas) para atravesar la BHE y ejercer su acción antitumoral en modelos ortotópicos de glioma.

Una aproximación alternativa que potencialmente permitiría actuar de manera específica sobre la MDK podría basarse en el uso de aptámeros (ácidos nucleicos de cadena sencilla con capacidad para reconocer dianas específicas mediante el plegamiento tridimensional de su estructura) dirigidos específicamente frente a este factor de crecimiento. Así, los aptámeros presentan una serie de ventajas con respecto a la utilización de anticuerpos como un menor tamaño y la ausencia de inmunogenicidad, que podrían ser de utilidad para el tratamiento del GBM. La acción antitumoral de este tipo de moléculas en el contexto de MDK ya ha sido evaluada en un modelo de neuroblastoma, en el que la administración de aptámeros específicos dirigidos frente a este factor neurotrófico redujo significativamente el crecimiento de tumores subcutáneos (Kishida et al., 2013) de manera que podría ser interesante evaluar la eficacia de esta estrategia en modelos de GBM.

b) Potencial terapéutico de la combinación de cannabinoides y TMZ

Los datos preclínicos obtenidos en los últimos años en los que se encontró la existencia de una potente acción antitumoral de la combinación de THC (+CBD) y TMZ en diversos modelos preclínicos de glioma han servido de base para el desarrollo de un primer ensayo clínico en el que se evaluó la acción combinada del fármaco cannabinoide Sativex y la TMZ en pacientes con GBM recidivado. Igualmente, un segundo ensayo en el que se evaluará el efecto de la combinación de THC y CBD sobre el tratamiento estándar del GBM (Radioterapia + TMZ) en pacientes de reciente diagnóstico se espera que empiece a principios de 2019 (www.clinicaltrials.gov número de identificación NCT03529448).

Las observaciones contenidas en la presente Tesis Doctoral por un lado apoyan los resultados que se habían obtenido anteriormente, aportando al mismo tiempo información no descrita hasta el momento acerca del efecto antitumoral de extractos cannabinoides que contienen una proporción de THC y CBD distinta a la contenida en el fármaco Sativex. Nuestros datos ponen el acento sobre las preparaciones que contienen una mayor cantidad de CBD que de THC (y que guardan similitud con la composición de algunos extractos de *Cannabis sativa* que se utilizan con fines terapéuticos). Los resultados que se presentan en este trabajo muestran que estos extractos ejercen un efecto inhibitorio muy potente sobre la capacidad de auto-renovación de cultivos de GICs, incluso aunque estas células presenten unos niveles elevados de MDK. Estudios preliminares llevados a cabo en nuestro grupo de investigación han mostrado que el tratamiento con TMZ reduce los niveles de expresión de MDK en tumores generados con células diferenciadas de glioma que presentan altos niveles de este factor neurotrófico. No hay que descartar, por tanto, que este fenómeno pueda ocurrir

también en GICs, donde una menor cantidad de MDK en el medio tras el tratamiento con TMZ podría sensibilizar estas células a la acción antitumoral de los cannabinoides.

Por otro lado, nuestra investigación claramente revela que el uso de combinaciones cannabinoides que contienen una mayor proporción de CBD que de THC actúa de una forma más eficiente sobre la población de GICs (manteniendo el mismo efecto sobre células diferenciadas) que la combinación 1:1, base del fármaco Sativex (**Figura D5**). Aunque en esta Tesis no hemos analizado en profundidad los mecanismos moleculares subyacentes a esta acción, estos resultados sugieren que la población iniciadora de tumores parece especialmente sensible al tratamiento con CBD. En este sentido, se ha descrito que la acción antitumoral ejercida por el CBD sobre distintos tipos de tumores es dependiente de su capacidad para generar especies reactivas de oxígeno (McAllister et al., 2011; Singer et al., 2015), que podrían ser más tóxicas o dañinas para las células iniciadoras de cáncer que para células diferenciadas dentro del tumor, debido a sus distintas características metabólicas (Chang et al., 2014; Chang et al., 2018).

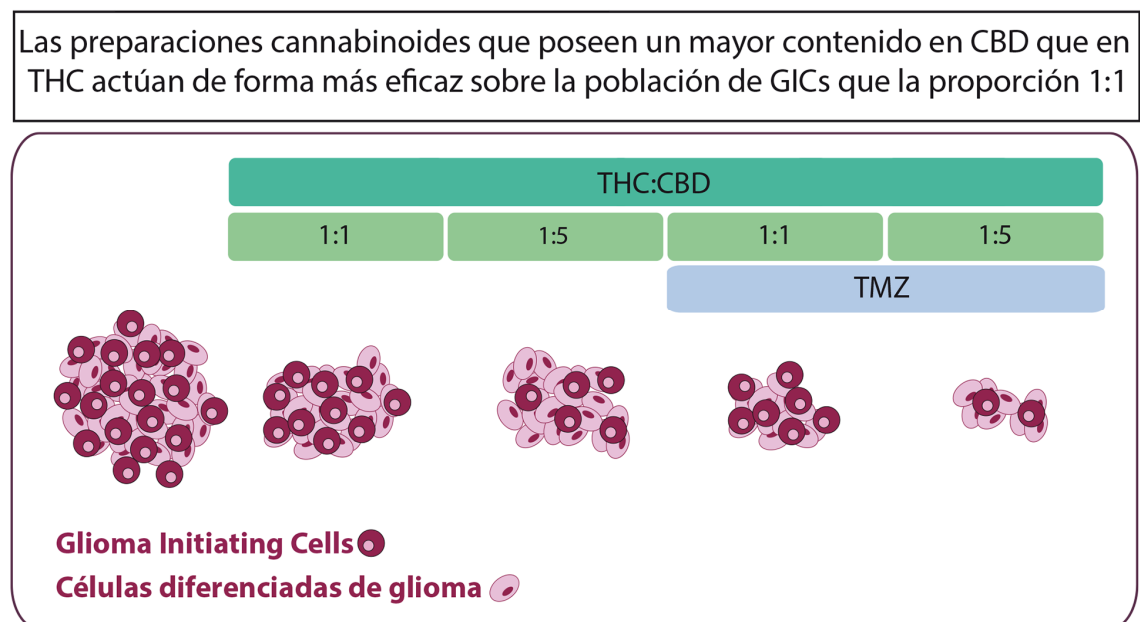


Figura D5. Representación esquemática del efecto producido por preparaciones cannabinoides que contienen distinta proporción de THC y CBD sobre diferentes poblaciones celulares presentes en tumores derivados de glioma

Un mayor contenido en CBD que en THC (como ocurre con la proporción THC:CBD 1:5 mostrada en la imagen) permite que los cannabinoides actúen de forma más eficiente sobre la población de GICs (manteniendo el mismo efecto sobre células diferenciadas) que una proporción equivalente de ambos compuestos, tanto cuando son administrados de forma individual como cuando son administrados en combinación con TMZ.

Además, trabajos publicados recientemente han demostrado que el CBD estimula la diferenciación de distintos cultivos de GICs, concediendo una especial importancia al factor inhibidor de la diferenciación ID1 (Soroceanu et al., 2013; Singer et al., 2015). Por último, también se ha observado que el tratamiento con CBD disminuye la expresión de la

glicoproteína P (una proteína perteneciente a la familia ABC implicada en la resistencia a múltiples fármacos antitumorales) en GICs (Holland et al., 2006). De esta forma, no podemos descartar que el CBD actúe sobre la población de GICs mediante una combinación de todos estos mecanismos. En cualquier caso, el hecho de que tanto la proporción de cannabinoides 1:1 como 1:5 potencie la acción antitumoral de la TMZ sobre GICs [y no lo haga el tratamiento individual con CBD, como ya se ha descrito en otros trabajos publicados previamente (Nabissi et al., 2015; Deng et al., 2016)] sugiere que el mecanismo que estimula la muerte celular en ambos casos podría ser semejante al promovido por la combinación de THC+TMZ. Distintos grupos de investigación han demostrado que la TMZ induce autofagia en células de glioma (Würstle et al., 2017), por lo que es posible que uno de los mecanismos que determine la capacidad de un agente antitumoral para producir un efecto combinado (aditivo o sinérgico) con los cannabinoides sea su capacidad para estimular la autofagia en células tumorales.

De esta manera, los resultados de esta Tesis sugieren que la combinación de TMZ con compuestos cannabinoides que presentan un mayor contenido de CBD que de THC podrían constituir una ventaja terapéutica (dado su mayor potencial antitumoral y su menor perfil psicoactivo) frente a la utilización de la proporción 1:1 de ambos compuestos en el tratamiento del GBM. A pesar de ello, más experimentos preclínicos dirigidos a conocer en profundidad los mecanismos moleculares que rigen estos efectos combinados en esta población de células son necesarios antes de dar el salto a su evaluación en ensayos clínicos.

CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas en esta Tesis Doctoral son:

1. El eje MDK/ALK estimula la auto-renovación y la capacidad tumorigénica de las células iniciadoras de tumores derivadas de glioma (GICs).
2. El papel ejercido por el eje MDK/ALK sobre las propiedades *stem-like* de las GICs es dependiente, al menos en parte, del control de la estabilidad del factor de transcripción SOX9.
3. La inhibición del eje MDK/ALK induce una respuesta autofágica temprana responsable de la degradación selectiva del factor de transcripción SOX9, lo que promueve una reprogramación de las células iniciadoras de tumores que conlleva una pérdida de sus propiedades *stem-like*.
4. Las preparaciones cannabinoides que contienen una mayor proporción de CBD que de THC actúan más eficientemente sobre la población de GICs, tanto individualmente como en combinación con TMZ, que las que poseen THC y CBD en una proporción 1:1 *in vitro* e *in vivo*.
5. La combinación de inhibidores del eje MDK/ALK y otros agentes antitumorales como la TMZ y los cannabinoides elimina la población de GICs *in vitro* y posee un potente efecto antitumoral en modelos animales de GBM, lo que podría constituir una estrategia terapéutica novedosa para el tratamiento de este tipo de tumores.

REFERENCIAS

- Abbott, N. J., Rönnbäck, L., & Hansson, E. (2006). Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(1), 41–53.
- Acanda de la Rocha, A. M., Sampron, N., Alonso, M. M., & Matheu, A. (2014). Role of SOX family of transcription factors in central nervous system tumors. *Am J Cancer Res*, 4(4), 312–324.
- Aghajan, Y., Levy, M. L., Malicki, D. M., & Crawford, J. R. (2016). Novel PPP1CB-ALK fusion protein in a high-grade glioma of infancy. *BMJ Case Reports*, 2016, 10–11.
- Aguado, T., Carracedo, A., Julien, B., Velasco, G., Milman, G., Mechoulam, R., ... Galve-Roperh, I. (2007). Cannabinoids induce glioma stem-like cell differentiation and inhibit gliomagenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 282(9), 6854–6862.
- Ahn, J.-S., Ann, E.-J., Kim, M.-Y., Yoon, J.-H., Lee, H.-J., Jo, E.-H., ... Park, H.-S. (2016). Autophagy negatively regulates tumor cell proliferation through phosphorylation dependent degradation of the Notch1 intracellular domain. *Oncotarget*, 7(48), 79047–79063.
- Ahronian, L. G., & Lewis, B. C. (2014). Using the RCAS-TVA System to Model Human Cancer in Mice. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2014(11), 1128-35.
- Akiyama, H., Lyons, J. P., Mori-Akiyama, Y., Yang, X., Zhang, R., Zhang, Z., ... de Crombrughe, B. (2004). Interactions between Sox9 and β -catenin control chondrocyte differentiation. *Genes & Development*, 18(9), 1072–1087.
- Alcantara Llaguno, S. R., Wang, Z., Sun, D., Chen, J., Xu, J., Kim, E., ... Parada, L. F. (2015). Adult Lineage-Restricted CNS Progenitors Specify Distinct Glioblastoma Subtypes. *Cancer Cell*, 28(4), 429–440.
- Alcantara Llaguno, S., Chen, J., Kwon, C. H., Jackson, E. L., Li, Y., Burns, D. K., ... Parada, L. F. (2009). Malignant Astrocytomas Originate from Neural Stem/Progenitor Cells in a Somatic Tumor Suppressor Mouse Model. *Cancer Cell*, 15(1), 45–56.
- Aldape, K., Zadeh, G., Mansouri, S., Reifenberger, G., & von Deimling, A. (2015). Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathologica*, 129(6), 829–848.
- Alonso, M. M., Jiang, H., Yokoyama, T., Xu, J., Bekele, N. B., Lang, F. F., ... Fueyo, J. (2008). Delta-24-RGD in combination with RAD001 induces enhanced anti-glioma effect via autophagic cell death. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 16(3), 487–493.
- Ardini, E., Magnaghi, P., Orsini, P., Galvani, A., & Menichincheri, M. (2010). Anaplastic Lymphoma Kinase: Role in specific tumours, and development of small molecule inhibitors for cancer therapy. *Cancer Letters*, 299(2), 81–94.

- Armstrong, J. L., Hill, D. S., McKee, C. S., Hernandez-Tiedra, S., Lorente, M., Lopez-Valero, I., ... Lovat, P. E. (2015). Exploiting cannabinoid-induced cytotoxic autophagy to drive melanoma cell death. *Journal of Investigative Dermatology*, 135(6), 1629–1637.
- Atwood, B. K., & Mackie, K. (2010). CB2: a cannabinoid receptor with an identity crisis. *British Journal of Pharmacology*, 160(3), 467–479.
- Bachoo, R. M., Maher, E. A., Ligon, K. L., Sharpless, N. E., Chan, S. S., You, M. J., ... DePinho, R. A. (2002). Epidermal growth factor receptor and Ink4a/Arf: convergent mechanisms governing terminal differentiation and transformation along the neural stem cell to astrocyte axis. *Cancer Cell*, 1(3), 269–277.
- Balvers, R. K., Lamfers, M. L. M., Kloezen, J. J., Kleijn, A., Berghauer Pont, L. M. E., Dirven, C. M. F., & Leenstra, S. (2015). ABT-888 enhances cytotoxic effects of temozolomide independent of MGMT status in serum free cultured glioma cells. *Journal of Translational Medicine*, 13(1), 74.
- Bass, A. J., Watanabe, H., Mermel, C. H., Yu, S., Perner, S., Verhaak, R. G., ... Meyerson, M. (2009). SOX2 is an amplified lineage-survival oncogene in lung and esophageal squamous cell carcinomas. *Nature Genetics*, 41(11), 1238–1242.
- Beier, D., Hau, P., Proescholdt, M., Lohmeier, A., Wischhusen, J., Oefner, P. J., ... Beier, C. P. (2007). CD133+ and CD133- Glioblastoma-Derived Cancer Stem Cells Show Differential Growth Characteristics and Molecular Profiles. *Cancer Research*, 67(9), 4010–4015.
- Bellocchio, L., Cervino, C., Pasquali, R., & Pagotto, U. (2008). The Endocannabinoid System and Energy Metabolism. *Journal of Neuroendocrinology*, 20(6), 850–857.
- Bernard, P., & Harley, V. R. (2010). Acquisition of SOX transcription factor specificity through protein-protein interaction, modulation of Wnt signalling and post-translational modification. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 42(3), 400–410.
- Binning, M. J., Niazi, T., Pedone, C. A., Lal, B., Eberhart, C. G., Kim, K. J., ... Fults, D. W. (2008). Hepatocyte Growth Factor and Sonic Hedgehog Expression in Cerebellar Neural Progenitor Cells Costimulate Medulloblastoma Initiation and Growth. *Cancer Research*, 68(19), 7838–7845.
- Blackhall, F., Ross Camidge, D., Shaw, A. T., Soria, J.-C., Solomon, B. J., Mok, T., ... Kim, D.-W. (2017). Final results of the large-scale multinational trial PROFILE 1005: efficacy and safety of crizotinib in previously treated patients with advanced/metastatic ALK-positive non-small-cell lung cancer. *ESMO Open*, 2(3), e000219.
- Blázquez, C., González-Feria, L., Alvarez, L., Haro, A., Casanova, M. L., & Guzmán, M. (2004). Cannabinoids inhibit the vascular endothelial growth factor pathway in gliomas. *Cancer Research*, 64(16), 5617–5623.

- Blazquez, C., Salazar, M., Carracedo, A., Lorente, M., Egia, A., Gonzalez-Feria, L., ... Guzman, M. (2008). Cannabinoids Inhibit Glioma Cell Invasion by Down-regulating Matrix Metalloproteinase-2 Expression. *Cancer Research*, 68(6), 1945–1952.
- Bleau, A.M., Hambardzumyan, D., Ozawa, T., Fomchenko, E. I., Huse, J. T., Brennan, C. W., & Holland, E. C. (2009). PTEN/PI3K/Akt pathway regulates the side population phenotype and ABCG2 activity in glioma tumor stem-like cells. *Cell Stem Cell*, 4(3), 226–235.
- Bowman, R. L., Wang, Q., Carro, A., Verhaak, R. G. W., & Squatrito, M. (2017). GlioVis data portal for visualization and analysis of brain tumor expression datasets. *Neuro-Oncology*, 19(1), 139–141.
- Brennan, C. W., Verhaak, R. G. W., McKenna, A., Campos, B., Nounshmehr, H., Salama, S. R., ... McLendon, R. (2013). The Somatic Genomic Landscape of Glioblastoma. *Cell*, 155(2), 462–477.
- Brien, T. O., Cranston, D., Fuggle, S., Bicknell, R., & Harris, A. L. (1996). The angiogenic factor Midkine is expressed in bladder cancer and overexpression correlates with a Poor Outcome in Patients with Invasive Cancers. *Cancer Research*, 56(11), 2515–2518
- Broadley, K. W. R., Hunn, M. K., Farrand, K. J., Price, K. M., Grasso, C., Miller, R. J., ... McConnell, M. J. (2011). Side Population is Not Necessary or Sufficient for a Cancer Stem Cell Phenotype in Glioblastoma Multiforme. *Stem Cells*, 29(3), 452–461.
- Caffarel, M. M., Sarrió, D., Palacios, J., Guzmán, M., & Sánchez, C. (2006). Delta9-tetrahydrocannabinol inhibits cell cycle progression in human breast cancer cells through Cdc2 regulation. *Cancer Research*, 66(13), 6615–6621.
- Cai, C., Wang, H., He, H. H., Chen, S., He, L., Ma, F., ... Yuan, X. (2013). ERG induces androgen receptor-mediated regulation of SOX9 in prostate cancer. *Journal of Clinical Investigation*, 123(3), 1109–1122.
- Calabrese, C., Poppleton, H., Kocak, M., Hogg, T. L., Fuller, C., Hamner, B., ... Gilbertson, R. J. (2007). A Perivascular Niche for Brain Tumor Stem Cells. *Cancer Cell*, 11(1), 69–82.
- Camidge, D. R., Bang, Y.-J., Kwak, E. L., Iafrate, A. J., Varella-Garcia, M., Fox, S. B., ... Shaw, A. T. (2012). Activity and safety of crizotinib in patients with ALK-positive non-small-cell lung cancer: updated results from a phase 1 study. *The Lancet. Oncology*, 13(10), 1011–1019.
- Cancer Genome Atlas Research Network, R., Friedman, A., Bigner, D., Van Meir, E. G., Brat, D. J., M. Mastrogiannis, G., ... Thomson, E. (2008). Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*, 455(7216), 1061–1068.

REFERENCIAS

- Carracedo, A., Gironella, M., Lorente, M., Garcia, S., Guzmán, M., Velasco, G., & Iovanna, J. L. (2006). Cannabinoids induce apoptosis of pancreatic tumor cells via endoplasmic reticulum stress-related genes. *Cancer Research*, 66(13), 6748–6755.
- Carracedo, A., Lorente, M., Egia, A., Blázquez, C., García, S., Giroux, V., ... Velasco, G. (2006). The stress-regulated protein p8 mediates cannabinoid-induced apoptosis of tumor cells. *Cancer Cell*, 9(4), 301–312.
- Casanova, M. L., Blázquez, C., Martínez-Palacio, J., Villanueva, C., Fernández-Aceñero, M. J., Huffman, J. W., ... Guzmán, M. (2003). Inhibition of skin tumor growth and angiogenesis in vivo by activation of cannabinoid receptors. *The Journal of Clinical Investigation*, 111(1), 43–50.
- Castillo, S. D., & Sanchez-Cespedes, M. (2012). The SOX family of genes in cancer development: biological relevance and opportunities for therapy. *Expert Opin Ther Targets*, 16(9), 903–919.
- Ceccarelli, M., Barthel, F. P., Malta, T. M., Sabedot, T. S., Salama, S. R., Murray, B. A., ... Verhaak, R. G. W. (2016). Molecular Profiling Reveals Biologically Discrete Subsets and Pathways of Progression in Diffuse Glioma. *Cell*, 164(3), 550–563.
- Chacko, A.-M., Li, C., Pryma, D. A., Brem, S., Coukos, G., & Muzykantov, V. (2013). Targeted delivery of antibody-based therapeutic and imaging agents to CNS tumors: crossing the blood-brain barrier divide. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 10(7), 907–926.
- Chang, C.-W., Chen, Y.-S., Chou, S.-H., Han, C.-L., Chen, Y.-J., Yang, C.-C., ... Lo, J.-F. (2014). Distinct subpopulations of head and neck cancer cells with different levels of intracellular reactive oxygen species exhibit diverse stemness, proliferation, and chemosensitivity. *Cancer Research*, 74(21), 6291–6305.
- Chang, C.-W., Chen, Y.-S., Tsay, Y.-G., Han, C.-L., Chen, Y.-J., Yang, C.-C., ... Lo, J.-F. (2018). ROS-independent ER stress-mediated NRF2 activation promotes warburg effect to maintain stemness-associated properties of cancer-initiating cells. *Cell Death & Disease*, 9(2), 194.
- Chen, J., Li, Y., Yu, T.-S., McKay, R. M., Burns, D. K., Kernie, S. G., & Parada, L. F. (2012). A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature*, 488(7412), 522–526.
- Chen, L., Zhang, Y., Yang, J., Hagan, J. P., & Li, M. (2013). Vertebrate animal models of glioma: understanding the mechanisms and developing new therapies. *Biochim Biophys Acta*, 1836(1), 158–165.
- Chen, S., Bu, G., Takei, Y., Sakamoto, K., Ikematsu, S., Muramatsu, T., & Kadomatsu, K. (2007). Midkine and LDL-receptor-related protein 1 contribute to the anchorage-independent cell growth of cancer cells. *Journal of Cell Science*, 120, 4009–4015.

- Cheng, L., Wu, Q., Huang, Z., Guryanova, O. A., Huang, Q., Shou, W., ... Bao, S. (2011). L1CAM regulates DNA damage checkpoint response of glioblastoma stem cells through NBS1. *The EMBO Journal*, 30(5), 800–813.
- Cheng, Y.-P., Lin, C., Lin, P.-Y., Cheng, C.-Y., Ma, H.-I., Chen, C.-M., & Hueng, D.-Y. (2014). Midkine expression in high grade gliomas: Correlation of this novel marker with proliferation and survival in human gliomas. *Surgical Neurology International*, 5(1), 78.
- Chiarle, R., Voena, C., Ambrogio, C., Piva, R., & Inghirami, G. (2008). The anaplastic lymphoma kinase in the pathogenesis of cancer. *Nature Reviews Cancer*, 8(1), 11–23.
- Chiba, R., Akiya, M., Hashimura, M., Oguri, Y., Inukai, M., Hara, A., & Saegusa, M. (2017). ALK signaling cascade confers multiple advantages to glioblastoma cells through neovascularization and cell proliferation. *PLoS ONE*, 12(8), 1–18.
- Choi, D. S., Blanco, E., Kim, Y.-S., Rodriguez, A. A., Zhao, H., Huang, T. H.-M., ... Chang, J. C. (2014). Chloroquine eliminates cancer stem cells through deregulation of Jak2 and DNMT1. *Stem Cells*, 32(9), 2309–2323.
- Choudhuri, R., Zhang, H. T., Donnini, S., Ziche, M., & Bicknell, R. (1997). An angiogenic role for the neurokines midkine and pleiotrophin in tumorigenesis. *Cancer Research*, 57(9), 1814–1819.
- Chow, L. M. L., Endersby, R., Zhu, X., Rankin, S., Qu, C., Zhang, J., ... Baker, S. J. (2011). Cooperativity within and among Pten, p53, and Rb pathways induces high-grade astrocytoma in adult brain. *Cancer Cell*, 19(3), 305–316.
- Cianchi, F., Papucci, L., Schiavone, N., Lulli, M., Magnelli, L., Vinci, M. C., ... Masini, E. (2008). Cannabinoid receptor activation induces apoptosis through tumor necrosis factor alpha-mediated ceramide de novo synthesis in colon cancer cells. *Clinical Cancer Research*, 14(23), 7691–7700.
- Cleary, A. S., Leonard, T. L., Gestl, S. A., & Gunther, E. J. (2014). Tumour cell heterogeneity maintained by cooperating subclones in Wnt-driven mammary cancers. *Nature*, 508(7494), 113–117.
- Cohen, S., Shoshana, O., Zelman-Toister, E., Maharshak, N., Binsky-Ehrenreich, I., Gordin, M., ... Shachar, I. (2012). The cytokine midkine and its receptor RPTPζ regulate B cell survival in a pathway induced by CD74. *Journal of Immunology*, 188(1), 259–269.
- Costa, D. B., Kobayashi, S., Pandya, S. S., Yeo, W.-L., Shen, Z., Tan, W., & Wilner, K. D. (2011). CSF Concentration of the Anaplastic Lymphoma Kinase Inhibitor Crizotinib. *Journal of Clinical Oncology*, 29(15), e443–e445.

- Cudaback, E., Marrs, W., Moeller, T., & Stella, N. (2010). The expression level of CB1 and CB2 receptors determines their efficacy at inducing apoptosis in astrocytomas. *PloS One*, 5(1), e8702.
- Cufi, S., Vazquez-Martin, A., Oliveras-Ferraros, C., Martin-Castillo, B., Vellon, L., & Menendez, J. A. (2011). Autophagy positively regulates the CD44(+) CD24(-/low) breast cancer stem-like phenotype. *Cell Cycle*, 10(22), 3871–3885.
- Dai, C., Celestino, J. C., Okada, Y., Louis, D. N., Fuller, G. N., & Holland, E. C. (2001). PDGF autocrine stimulation dedifferentiates cultured astrocytes and induces oligodendrogliomas and oligoastrocytomas from neural progenitors and astrocytes in vivo. *Genes & Development*, 15(15), 1913–1925.
- Dai, L.C., Wang, X., Yao, X., Lu, Y.-L., Ping, J.-L., & He, J.-F. (2007). Antisense oligonucleotide targeting midkine suppresses in vivo angiogenesis. *World Journal of Gastroenterology*, 13(8), 1208–1213.
- Dai, L.C., Yao, X., Wang, X., Niu, S.-Q., Zhou, L.-F., Fu, F.-F., ... Ping, J.-L. (2009). In vitro and in vivo suppression of hepatocellular carcinoma growth by midkine-antisense oligonucleotide-loaded nanoparticles. *World Journal of Gastroenterology*, 15(16), 1966–1972.
- Das, A., Cheng, R. R., Hilbert, M. L. T., Dixon-Moh, Y. N., Decandio, M., Alex Vandergrift W., ... Giglio, P. (2015). Synergistic Effects of Crizotinib and Temozolomide in Experimental FIG-ROS1 Fusion-Positive Glioblastoma. *Cancer Growth and Metastasis*, 8, 51–60.
- Das, S., & Marsden, P. A. (2013). Angiogenesis in glioblastoma. *The New England Journal of Medicine*, 369(16), 1561–1563.
- de Crombrughe, B., Lefebvre, V., Behringer, R. R., Bi, W., Murakami, S., & Huang, W. (2000). Transcriptional mechanisms of chondrocyte differentiation. *Matrix Biology*, 19(5), 389–394.
- De Petrocellis, L., Ligresti, A., Schiano Moriello, A., Iappelli, M., Verde, R., Stott, C. G., ... Di Marzo, V. (2013). Non-THC cannabinoids inhibit prostate carcinoma growth in vitro and in vivo: Pro-apoptotic effects and underlying mechanisms. *British Journal of Pharmacology*, 168(1), 79–102.
- De Petrocellis, L., Marini, P., Matias, I., Moriello, A. S., Starowicz, K., Cristino, L., ... Di Marzo, V. (2007). Mechanisms for the coupling of cannabinoid receptors to intracellular calcium mobilization in rat insulinoma beta-cells. *Experimental Cell Research*, 313(14), 2993–3004.
- Dean, M., Fojo, T., & Bates, S. (2005). Tumour stem cells and drug resistance. *Nature Reviews. Cancer*, 5(4), 275–284.

- Degenhardt, K., Mathew, R., Beaudoin, B., Bray, K., Anderson, D., Chen, G., ... White, E. (2006). Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell*, 10(1), 51–64.
- Demuth, D. G., & Molleman, A. (2006). Cannabinoid signalling. *Life Sciences*, 78(6), 549–563.
- Deng, L., Ng, L., Ozawa, T., & Stella, N. (2016). Quantitative Analyses of Synergistic Responses between Cannabidiol and DNA-Damaging Agents on the Proliferation and Viability of Glioblastoma and Neural Progenitor Cells in Culture. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 360(1), 215–224.
- Devane, W. A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R. G., Stevenson, L. A., Griffin, G., ... Mechoulam, R. (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, 258(5090), 1946–1949.
- Di Marzo, V. (2018). New approaches and challenges to targeting the endocannabinoid system. *Nature Reviews Drug Discovery*.
- Dianat, N., Le Viet, B., Gobbo, E., Auger, N., Bieche, I., Bennaceur-Griscelli, A., & Griscelli, F. (2015). Midkine Lacking Its Last 40 Amino Acids Acts on Endothelial and Neuroblastoma Tumor Cells and Inhibits Tumor Development. *Molecular Cancer Therapeutics*, 14(1), 213–224.
- Díaz-Alonso, J., de Salas-Quiroga, A., Paraíso-Luna, J., García-Rincón, D., Garcez, P. P., Parsons, M., ... Galve-Roperh, I. (2016). Loss of Cannabinoid CB₁ Receptors Induces Cortical Migration Malformations and Increases Seizure Susceptibility. *Cerebral Cortex*, 27(11), 5303–5317.
- Dietrich, J., Diamond, E. L., & Kesari, S. (2010). Glioma stem cell signaling: therapeutic opportunities and challenges. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 10(5), 709–722.
- Dirks, W. G., Fähnrich, S., Lis, Y., Becker, E., MacLeod, R. A. F., & Drexler, H. G. (2002). Expression and functional analysis of the anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene in tumor cell lines. *International Journal of Cancer*, 100(1), 49–56.
- Doebele, R. C., Pilling, A. B., Aisner, D. L., Kutateladze, T. G., Le, A. T., Weickhardt, A. J., ... Camidge, D. R. (2012). Mechanisms of Resistance to Crizotinib in Patients with ALK Gene Rearranged Non-Small Cell Lung Cancer. *Clinical Cancer Research*, 18(5), 1472–1482.
- Dolma, S., Selvadurai, H. J., Lan, X., Lee, L., Kushida, M., Voisin, V., ... Dirks, P. B. (2016). Inhibition of Dopamine Receptor D4 Impedes Autophagic Flux, Proliferation, and Survival of Glioblastoma Stem Cells. *Cancer Cell*, 29(6), 859–873.
- Donadelli, M., Dando, I., Zaniboni, T., Costanzo, C., Dalla Pozza, E., Scupoli, M. T., ... Palmieri, M. (2011). Gemcitabine/cannabinoid combination triggers autophagy in pancreatic cancer cells through a ROS-mediated mechanism. *Cell Death & Disease*, 2(4), e152.

- Drivdahl, R., Haugk, K. H., Sprenger, C. C., Nelson, P. S., Tennant, M. K., & Plymate, S. R. (2004). Suppression of growth and tumorigenicity in the prostate tumor cell line M12 by overexpression of the transcription factor SOX9. *Oncogene*, 23(26), 4584–4593.
- Dunlap, S. M., Celestino, J., Wang, H., Jiang, R., Holland, E. C., Fuller, G. N., & Zhang, W. (2007). Insulin-like growth factor binding protein 2 promotes glioma development and progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(28), 11736–11741.
- Eberl, M., Klingler, S., Mangelberger, D., Loipetzberger, A., Damhofer, H., Zoidl, K., ... Aberger, F. (2012). Hedgehog-EGFR cooperation response genes determine the oncogenic phenotype of basal cell carcinoma and tumour-initiating pancreatic cancer cells. *EMBO Molecular Medicine*, 4(3), 218–233.
- Elgendy, M., Sheridan, C., Brumatti, G., & Martin, S. J. (2011). Oncogenic Ras-induced expression of Noxa and Beclin-1 promotes autophagic cell death and limits clonogenic survival. *Molecular Cell*, 42(1), 23–35.
- Englund, C., Birve, A., Falileeva, L., Grabbe, C., & Palmer, R. H. (2006). Miple1 and miple2 encode a family of MK/PTN homologues in *Drosophila melanogaster*. *Development Genes and Evolution*, 216(1), 10–18.
- Englund, C., Lorén, C. E., Grabbe, C., Varshney, G. K., Deleuil, F., Hallberg, B., & Palmer, R. H. (2003). Jeb signals through the Alk receptor tyrosine kinase to drive visceral muscle fusion. *Nature*, 425(6957), 512–516.
- Erdogan, S., Doganlar, Z. B., Doganlar, O., Turkecul, K., & Serttas, R. (2017). Inhibition of Midkine Suppresses Prostate Cancer CD133 + Stem Cell Growth and Migration. *The American Journal of the Medical Sciences*, 354(3), 299–309
- Erdogan, S., Turkecul, K., Dibirdik, I., Doganlar, O., Doganlar, Z. B., Bilir, A., & Oktem, G. (2018). Midkine downregulation increases the efficacy of quercetin on prostate cancer stem cell survival and migration through PI3K/AKT and MAPK/ERK pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 107, 793–805.
- Fang, X., Huang, Z., Zhou, W., Wu, Q., Sloan, A. E., Ouyang, G., ... Bao, S. (2014). The Zinc Finger Transcription Factor ZFX Is Required for Maintaining the Tumorigenic Potential of Glioblastoma Stem Cells. *Stem Cells*, 32(8), 2033–2047.
- Finak, G., Bertos, N., Pepin, F., Sadekova, S., Souleimanova, M., Zhao, H., ... Park, M. (2008). Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer. *Nature Medicine*, 14(5), 518–527.
- Fisher, G. H., Orsulic, S., Holland, E., Hively, W. P., Li, Y., Lewis, B. C., ... Varmus, H. E. (1999). Development of a flexible and specific gene delivery system for production of murine tumor models. *Oncogene*, 18(38), 5253–5260.

- Francipane, M. G., & Lagasse, E. (2013). Selective targeting of human colon cancer stem-like cells by the mTOR inhibitor Torin-1. *Oncotarget*, 4(11), 1948–1962.
- Frederick, L., Wang, X. Y., Eley, G., & James, C. D. (2000). Diversity and frequency of epidermal growth factor receptor mutations in human glioblastomas. *Cancer Research*, 60(5), 1383–1387.
- Friedmann-Morvinski, D., Bushong, E. A., Ke, E., Soda, Y., Marumoto, T., Singer, O., ... Verma, I. M. (2012). Dedifferentiation of neurons and astrocytes by oncogenes can induce gliomas in mice. *Science*, 338(6110), 1080–1084.
- Galavotti, S., Bartesaghi, S., Faccenda, D., Shaked-Rabi, M., Sanzone, S., McEvoy, A., ... Salomoni, P. (2013). The autophagy-associated factors DRAM1 and p62 regulate cell migration and invasion in glioblastoma stem cells. *Oncogene*, 32(6), 699–712.
- Galkin, A. V, Melnick, J. S., Kim, S., Hood, T. L., Li, N., Li, L., ... Warmuth, M. (2007). Identification of NVP-TAE684, a potent, selective, and efficacious inhibitor of NPM-ALK. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(1), 270–275.
- Galli, R., Binda, E., Orfanelli, U., Cipelletti, B., Gritti, A., De Vitis, S., ... Vescovi, A. (2004). Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Research*, 64(19), 7011–7021.
- Galluzzi, L., Baehrecke, E. H., Ballabio, A., Boya, P., Bravo-San Pedro, J. M., Cecconi, F., ... Kroemer, G. (2017). Molecular definitions of autophagy and related processes. *The EMBO Journal*, 36(13), 1811–1836.
- Galluzzi, L., Pietrocola, F., Bravo-San Pedro, J. M., Amaravadi, R. K., Baehrecke, E. H., Cecconi, F., ... Kroemer, G. (2015). Autophagy in malignant transformation and cancer progression. *The EMBO Journal*, 34(7), 856–880.
- Galve-Roperh, I., Chiurchiù, V., Díaz-Alonso, J., Bari, M., Guzmán, M., & Maccarrone, M. (2013). Cannabinoid receptor signaling in progenitor/stem cell proliferation and differentiation. *Progress in Lipid Research*, 52(4), 633–650.
- Galve-Roperh, I., Sánchez, C., Cortés, M. L., Gómez del Pulgar, T., Izquierdo, M., & Guzmán, M. (2000). Anti-tumoral action of cannabinoids: involvement of sustained ceramide accumulation and extracellular signal-regulated kinase activation. *Nature Medicine*, 6(3), 313–319.
- Gangemi, R. M. R., Griffero, F., Marubbi, D., Perera, M., Capra, M. C., Malatesta, P., ... Corte, G. (2009). SOX2 silencing in glioblastoma tumor-initiating cells causes stop of proliferation and loss of tumorigenicity. *Stem Cells*, 27(1), 40–48.

- Gao, J., Zhang, J.-Y., Li, Y.-H., & Ren, F. (2015). Decreased expression of SOX9 indicates a better prognosis and inhibits the growth of glioma cells by inducing cell cycle arrest. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(9), 10130–10138.
- Gaoni, Y., & Mechoulam, R. (1964). Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *Journal of the American Chemical Society*, 86(8), 1646–1647.
- García-Prat, L., Martínez-Vicente, M., Perdiguero, E., Ortet, L., Rodríguez-Ubreva, J., Rebollo, E., ... Muñoz-Cánoves, P. (2016). Autophagy maintains stemness by preventing senescence. *Nature*, 529(7584), 37–42.
- Garros-Regulez, L., Aldaz, P., Arrizabalaga, O., Moncho-Amor, V., Carrasco-Garcia, E., Manterola, L., ... Matheu, A. (2016). mTOR inhibition decreases SOX2-SOX9 mediated glioma stem cell activity and temozolomide resistance. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 20(4), 393–405.
- Garufi, A., Pucci, D., D’Orazi, V., Cirone, M., Bossi, G., Avantaggiati, M. L., & D’Orazi, G. (2014). Degradation of mutant p53H175 protein by Zn(II) through autophagy. *Cell Death & Disease*, 5(5), e1271.
- Glasgow, S. M., Carlson, J. C., Zhu, W., Chaboub, L. S., Kang, P., Lee, H. K., ... Deneen, B. (2017). Glia-specific enhancers and chromatin structure regulate NFIA expression and glioma tumorigenesis. *Nature Neuroscience*, 20(11), 1520–1528.
- Gómez del Pulgar, T., Velasco, G., Sánchez, C., Haro, A., & Guzmán, M. (2002). De novo-synthesized ceramide is involved in cannabinoid-induced apoptosis. *The Biochemical Journal*, 363(Pt 1), 183–188.
- Gong, C., Bauvy, C., Tonelli, G., Yue, W., Deloménie, C., Nicolas, V., ... Mehrpour, M. (2013). Beclin 1 and autophagy are required for the tumorigenicity of breast cancer stem-like/progenitor cells. *Oncogene*, 32(18), 2261–2272, 2272e.1-11.
- Gouzi, J. Y., Moog-Lutz, C., Vigny, M., & Brunet-de Carvalho, N. (2005). Role of the subcellular localization of ALK tyrosine kinase domain in neuronal differentiation of PC12 cells. *Journal of Cell Science*, 118(24), 5811–5823.
- Gramage, E., Li, J., & Hitchcock, P. (2014). The expression and function of midkine in the vertebrate retina. *British Journal of Pharmacology*, 171(4), 913–923.
- Gravendeel, L. A. M., Kouwenhoven, M. C. M., Gevaert, O., de Rooi, J. J., Stubbs, A. P., Duijm, J. E., ... French, P. J. (2009). Intrinsic gene expression profiles of gliomas are a better predictor of survival than histology. *Cancer Research*, 69(23), 9065–9072.
- Green, D. R., & Levine, B. (2014). To be or not to be? How selective autophagy and cell death govern cell fate. *Cell*, 157(1), 65–75.

- Grimaldi, C., Pisanti, S., Laezza, C., Malfitano, A. M., Santoro, A., Vitale, M., ... Bifulco, M. (2006). Anandamide inhibits adhesion and migration of breast cancer cells. *Experimental Cell Research*, 312(4), 363–373.
- Grzelinski, M., Steinberg, F., Martens, T., Czubayko, F., Lamszus, K., & Aigner, A. (2009). Enhanced Antitumorigenic Effects in Glioblastoma on Double Targeting of Pleiotrophin and Its Receptor ALK. *Neoplasia*, 11(2), 145–156.
- Guan, J.-L., Simon, A. K., Prescott, M., Menendez, J. A., Liu, F., Wang, F., ... Zhang, J. (2013). Autophagy in stem cells. *Autophagy*, 9(6), 830–849.
- Guan, J., Umapathy, G., Yamazaki, Y., Wolfstetter, G., Mendoza, P., Pfeifer, K., ... Palmer, R. H. (2015). FAM150A and FAM150B are activating ligands for anaplastic lymphoma kinase. *ELife*, 4, e09811.
- Güngör, C., Zander, H., Effenberger, K. E., Vashist, Y. K., Kalinina, T., Izicki, J. R., ... Bockhorn, M. (2011). Notch signaling activated by replication stress-induced expression of Midkine drives epithelial-mesenchymal transition and chemoresistance in pancreatic cancer. *Cancer Research*, 71(14), 5009–5019.
- Guo, W., Keckesova, Z., Donaher, J. L., Shibue, T., Tischler, V., Reinhardt, F., ... Weinberg, R. A. (2012). Slug and Sox9 cooperatively determine the mammary stem cell state. *Cell*, 148(5), 1015–1028.
- Gustafsson, S. B., Lindgren, T., Jonsson, M., & Jacobsson, S. O. P. (2009). Cannabinoid receptor-independent cytotoxic effects of cannabinoids in human colorectal carcinoma cells: synergism with 5-fluorouracil. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 63(4), 691–701.
- Guzmán, M., Galve-Roperh, I., & Sánchez, C. (2001). Ceramide: A new second messenger of cannabinoid action. *Trends in Pharmacological Sciences*, 22(1), 19–22.
- Guzmán, M., Duarte, M. J., Blázquez, C., Ravina, J., Rosa, M. C., Galve-Roperh, I., ... González-Feria, L. (2006). A pilot clinical study of Δ9-tetrahydrocannabinol in patients with recurrent glioblastoma multiforme. *British Journal of Cancer*, 95(2), 197–203.
- Haffner-Luntzer, M., Heilmann, A., Rapp, A. E., Roessler, R., Schinke, T., Amling, M., ... Liedert, A. (2016). Antagonizing midkine accelerates fracture healing in mice by enhanced bone formation in the fracture callus. *British Journal of Pharmacology*, 173(14), 2237–2249.
- Hallberg, B., & Palmer, R. H. (2013). Mechanistic insight into ALK receptor tyrosine kinase in human cancer biology. *Nature Reviews Cancer*, 13(10), 685–700.
- Hamerlik, P., Lathia, J. D., Rasmussen, R., Wu, Q., Bartkova, J., Lee, M., ... Bartek, J. (2012). Autocrine VEGF-VEGFR2-Neuropilin-1 signaling promotes glioma stem-like cell viability and tumor growth. *The Journal of Experimental Medicine*, 209(3), 507–520.

REFERENCIAS

- Hanada, T., Noda, N. N., Satomi, Y., Ichimura, Y., Fujioka, Y., Takao, T., ... Ohsumi, Y. (2007). The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(52), 37298–37302.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57–70.
- Hanuš, L. O., Meyer, S. M., Muñoz, E., Taglialatela-Scafati, O., & Appendino, G. (2016). Phytocannabinoids: a unified critical inventory. *Natural Product Reports*, 33(12), 1357–1392.
- Hao, H., Maeda, Y., Fukazawa, T., Yamatsuji, T., Takaoka, M., Bao, X.-H., ... Naomoto, Y. (2013). Inhibition of the Growth Factor MDK/Midkine by a Novel Small Molecule Compound to Treat Non-Small Cell Lung Cancer. *PLoS ONE*, 8(8), e71093.
- Happold, C., Stojcheva, N., Silginer, M., Weiss, T., Roth, P., Reifenberger, G., & Weller, M. (2018). Transcriptional control of O⁶-methylguanine DNA methyltransferase expression and temozolomide resistance in glioblastoma. *Journal of Neurochemistry*, 144(6), 780–790.
- Harford-Wright, E., Andre-Gregoire, G., Jacobs, K. A., Treps, L., Le Gonidec, S., Leclair, H. M., ... Gavard, J. (2017). Pharmacological targeting of apelin impairs glioblastoma growth. *Brain*, 140(11), 2939–2954.
- Hart, S., Fischer, O. M., & Ullrich, A. (2004). Cannabinoids induce cancer cell proliferation via tumor necrosis factor alpha-converting enzyme (TACE/ADAM17)-mediated transactivation of the epidermal growth factor receptor. *Cancer Research*, 64(6), 1943–1950.
- Hartmann, C., Hentschel, B., Wick, W., Capper, D., Felsberg, J., Simon, M., ... von Deimling, A. (2010). Patients with IDH1 wild type anaplastic astrocytomas exhibit worse prognosis than IDH1-mutated glioblastomas, and IDH1 mutation status accounts for the unfavorable prognostic effect of higher age: implications for classification of gliomas. *Acta Neuropathologica*, 120(6), 707–18.
- Haustein, M., Ramer, R., Linnebacher, M., Manda & K., Hinz, B. (2014). Cannabinoids increase lung cancer cell lysis by lymphokine-activated killer cells via upregulation of ICAM-1. *Biochemical Pharmacology*, 92(2): 312-325.
- He, D., Chen, H., Muramatsu, H., & Lasek, A. W. (2015). Ethanol activates midkine and anaplastic lymphoma kinase signaling in neuroblastoma cells and in the brain. *Journal of Neurochemistry*, 135(3), 508–521.
- Hegi, M. E., Diserens, A.-C., Gorlia, T., Hamou, M.-F., de Tribolet, N., Weller, M., ... Stupp, R. (2005). *MGMT* Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma. *New England Journal of Medicine*, 352(10), 997–1003.

- Hernández-Tiedra, S., Fabriàs, G., Dávila, D., Salanueva, Í. J., Casas, J., Montes, L. R., ... Velasco, G. (2016). Dihydroceramide accumulation mediates cytotoxic autophagy of cancer cells via autolysosome destabilization. *Autophagy*, 12(11), 2213–2229.
- Herradón, G., & Pérez-García, C. (2014). Targeting midkine and pleiotrophin signalling pathways in addiction and neurodegenerative disorders: recent progress and perspectives. *British Journal of Pharmacology*, 171(4), 837–848.
- Hiraoka, K., Hayashi, T., Kaneko, R., Nasu-Nishimura, Y., Koyama-Nasu, R., Kawasaki, Y., & Akiyama, T. (2015). SOX9-mediated upregulation of LGR5 is important for glioblastoma tumorigenicity. *Biochem Biophys Res Commun*, 460(2), 216–221.
- Hoffmann, S. A., Hos, D., Küspert, M., Lang, R. A., Lovell-Badge, R., Wegner, M., & Reiprich, S. (2014). Stem cell factor Sox2 and its close relative Sox3 have differentiation functions in oligodendrocytes. *Development*, 141(1), 39–50.
- Holland, E. C., Hively, W. P., DePinho, R. A., & Varmus, H. E. (1998). A constitutively active epidermal growth factor receptor cooperates with disruption of G1 cell-cycle arrest pathways to induce glioma-like lesions in mice. *Genes & Development*, 12(23), 3675–3685.
- Holland, E. C., & Varmus, H. E. (1998). Basic fibroblast growth factor induces cell migration and proliferation after glia-specific gene transfer in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(3), 1218–1223.
- Holland, E. C., Celestino, J., Dai, C., Schaefer, L., Sawaya, R. E., & Fuller, G. N. (2000). Combined activation of Ras and Akt in neural progenitors induces glioblastoma formation in mice. *Nature Genetics*, 25(1), 55–57.
- Holland, M. L., Panetta, J. A., Hoskins, J. M., Bebawy, M., Roufogalis, B. D., Allen, J. D., & Arnold, J. C. (2006). The effects of cannabinoids on P-glycoprotein transport and expression in multidrug resistant cells. *Biochemical Pharmacology*, 71(8), 1146–1154.
- Horiba, M., Kadomatsu, K., Yasui, K., Lee, J.-K., Takenaka, H., Sumida, A., ... Kodama, I. (2006). Midkine plays a protective role against cardiac ischemia/reperfusion injury through a reduction of apoptotic reaction. *Circulation*, 114(16), 1713–1720.
- Hu, R., Yan, Y., Li, Q., Lin, Y., Jin, W., Li, H., ... Pang, T. (2010). Increased drug efflux along with midkine gene high expression in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia cells. *International Journal of Hematology*, 92(1), 105–110.
- Hu, Y., & Smyth, G. K. (2009). ELDA: Extreme limiting dilution analysis for comparing depleted and enriched populations in stem cell and other assays. *Journal of Immunological Methods*, 347(1–2), 70–78.

- Huang, Y., Hoque, M. O., Wu, F., Trink, B., Sidransky, D., & Ratovitski, E. A. (2008). Midkine induces epithelial-mesenchymal transition through Notch2/Jak2-Stat3 signaling in human keratinocytes. *Cell Cycle*, 7(11), 1613–1622.
- Huang, H., Li, J., Lu, Y., Min, L., Li, D., & Dai, L. (2015). Role of midkine-progranulin interaction during angiogenesis of hepatocellular carcinoma. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(8), 8809–8820.
- Ignatova, T. N., Kukekov, V. G., Laywell, E. D., Suslov, O. N., Vrionis, F. D., & Steindler, D. A. (2002). Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro. *Glia*, 39(3), 193–206.
- Ikematsu, S., Yano, A., Aridome, K., Kikuchi, M., Kumai, H., Nagano, H., ... Muramatsu, T. (2000). Serum midkine levels are increased in patients with various types of carcinomas. *British Journal of Cancer*, 83(6), 701–706.
- Ikushima, H., Todo, T., Ino, Y., Takahashi, M., Miyazawa, K., & Miyazono, K. (2009). Autocrine TGF- β Signaling Maintains Tumorigenicity of Glioma-Initiating Cells through Sry-Related HMG-Box Factors. *Cell Stem Cell*, 5(5), 504–514.
- Isakson, P., Bjørås, M., Bøe, S. O., & Simonsen, A. (2010). Autophagy contributes to therapy-induced degradation of the PML/RARA oncoprotein. *Blood*, 116(13), 2324–2331.
- Iwahara, T., Fujimoto, J., Wen, D., Cupples, R., Bucay, N., Arakawa, T., ... Yamamoto, T. (1997). Molecular characterization of ALK, a receptor tyrosine kinase expressed specifically in the nervous system. *Oncogene*, 14(4), 439–449.
- Jeon, H.-M., Sohn, Y.-W., Oh, S.-Y., Oh, S.-Y., Kim, S.-H., Beck, S., ... Kim, H. (2011). ID4 imparts chemoresistance and cancer stemness to glioma cells by derepressing miR-9*-mediated suppression of SOX2. *Cancer Research*, 71(9), 3410–3421.
- Jiang, Z.-F., Shao, L.-J., Wang, W.-M., Yan, X.-B., & Liu, R.-Y. (2012). Decreased expression of Beclin-1 and LC3 in human lung cancer. *Molecular Biology Reports*, 39(1), 259–267.
- Johnson, T. W., Richardson, P. F., Bailey, S., Brooun, A., Burke, B. J., Collins, M. R., ... Edwards, M. P. (2014). Discovery of (10 R)-7-Amino-12-fluoro-2,10,16-trimethyl-15-oxo-10,15,16,17-tetrahydro-2H -8,4-(metheno)pyrazolo[4,3- h][2,5,11]-benzoxadiazacyclotetradecine-3-carbonitrile (PF-06463922), a Macrocyclic Inhibitor of Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) and c-ros Oncogene 1 (ROS1) with Preclinical Brain Exposure and Broad-Spectrum Potency against ALK-Resistant Mutations. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(11), 4720–4744.
- Jones, D. R. (2014). Measuring midkine: the utility of midkine as a biomarker in cancer and other diseases. *British Journal of Pharmacology*, 171(12), 2925–2939.

- Joo, K. M., Jin, J., Kim, E., Ho Kim, K., Kim, Y., Gu Kang, B., ... Nam, D.-H. (2012). MET signaling regulates glioblastoma stem cells. *Cancer Research*, 72(15), 3828–3838.
- Joshi, K., Banasavadi-Siddegowda, Y., Mo, X., Kim, S.-H., Mao, P., Kig, C., ... Nakano, I. (2013). MELK-dependent FOXM1 phosphorylation is essential for proliferation of glioma stem cells. *Stem Cells*, 31(6), 1051–1063.
- Junca, A., Villalva, C., Tachon, G., Rivet, P., Cortes, U., Guilloteau, K., ... Karayan-Tapon, L. (2017). Crizotinib targets in glioblastoma stem cells. *Cancer Medicine*, 6(11), 2625–2634.
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., ... Yoshimori, T. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *The EMBO Journal*, 19(21), 5720–5728.
- Kadomatsu, K., Tomomura, M., & Muramatsu, T. (1988). cDNA cloning and sequencing of a new gene intensely expressed in early differentiation stages of embryonal carcinoma cells and in mid-gestation period of mouse embryogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 151(3): 1312-8.
- Kadomatsu, K., Huang, R. P., Suganuma, T., Murata, F., & Muramatsu, T. (1990). A retinoic acid responsive gene MK found in the teratocarcinoma system is expressed in spatially and temporally controlled manner during mouse embryogenesis. *The Journal of Cell Biology*, 110(3), 607–616.
- Kadomatsu, K., Kishida, S., & Tsubota, S. (2013). The heparin-binding growth factor midkine: the biological activities and candidate receptors. *Journal of Biochemistry*, 153(6), 511–521.
- Kamachi, Y., & Kondoh, H. (2013). Sox proteins: regulators of cell fate specification and differentiation. *Development*, 140(20), 4129–4144.
- Kaname, T., Kadomatsu, K., Aridome, K., Yamashita, S., Sakamoto, K., Ogawa, M., ... Yamamura, K. (1996). The Expression of Truncated MK in Human Tumors. *Biochem Biophys Res Commun* 219(1), 256–260.
- Kang, H. C. (2004). Identification of Genes with Differential Expression in Acquired Drug-Resistant Gastric Cancer Cells Using High-Density Oligonucleotide Microarrays. *Clinical Cancer Research*, 10(1), 272–284.
- Kang, H. C., Kim, I. J., Park, H. W., Jang, S. G., Ahn, S. A., Yoon, S. N., ... Park, J. G. (2007). Regulation of MDK expression in human cancer cells modulates sensitivities to various anticancer drugs: MDK overexpression confers to a multi-drug resistance. *Cancer Letters*, 247(1–2), 40–47.

- Kang, P., Lee, H. K., Glasgow, S. M., Finley, M., Donti, T., Gaber, Z. B., ... Deneen, B. (2012). Sox9 and NFIA coordinate a transcriptional regulatory cascade during the initiation of gliogenesis. *Neuron*, 74(1), 79–94.
- Kanzawa, T., Germano, I. M., Komata, T., Ito, H., Kondo, Y., & Kondo, S. (2004). Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. *Cell Death and Differentiation*, 11(4), 448–457.
- Kanzawa, T., Zhang, L., Xiao, L., Germano, I. M., Kondo, Y., & Kondo, S. (2005). Arsenic trioxide induces autophagic cell death in malignant glioma cells by upregulation of mitochondrial cell death protein BNIP3. *Oncogene*, 24(6), 980–991.
- Karagkounis, G., Stranjalis, G., Argyrakos, T., Pantelaion, V., Mastoris, K., Rontogianni, D., ... Tiniakos, D. (2017). Anaplastic lymphoma kinase expression and gene alterations in glioblastoma: correlations with clinical outcome. *Journal of Clinical Pathology*, 70(7), 593–599.
- Katayama, M., Kawaguchi, T., Berger, M. S., & Pieper, R. O. (2007). DNA damaging agent-induced autophagy produces a cytoprotective adenosine triphosphate surge in malignant glioma cells. *Cell Death and Differentiation*, 14(3), 548–558.
- Katayama, R., Friboulet, L., Koike, S., Lockerman, E. L., Khan, T. M., Gainor, J. F., ... Shaw, A. T. (2014). Two novel ALK mutations mediate acquired resistance to the next-generation ALK inhibitor alectinib. *Clinical Cancer Research*, 20(22), 5686–5696.
- Katayama, R., Shaw, A. T., Khan, T. M., Mino-Kenudson, M., Solomon, B. J., Halmos, B., ... Engelman, J. A. (2012). Mechanisms of Acquired Crizotinib Resistance in ALK-Rearranged Lung Cancers. *Science Translational Medicine*, 4(120), 120ra17.
- Kemper, K., Sprick, M. R., De Bree, M., Scopelliti, A., Vermeulen, L., Hoek, M., ... Medema, J. P. (2010). The AC133 epitope, but not the CD133 protein, is lost upon cancer stem cell differentiation. *Cancer Research*, 70(2), 719–729.
- Kim, Y. H., Ozasa, H., Nagai, H., Sakamori, Y., Yoshida, H., Yagi, Y., ... Mishima, M. (2013). High-dose crizotinib for brain metastases refractory to standard-dose crizotinib. *Journal of Thoracic Oncology*, 8(9), e85-6.
- Kishida, S., Mu, P., Miyakawa, S., Fujiwara, M., Abe, T., Sakamoto, K., ... Kadomatsu, K. (2013). Midkine promotes neuroblastoma through Notch2 signaling. *Cancer Research*, 73(4), 1318–1327.
- Ko, A., Kanehisa, A., Martins, I., Senovilla, L., Chargari, C., Dugue, D., ... Deutsch, E. (2014). Autophagy inhibition radiosensitizes in vitro, yet reduces radioresponses in vivo due to deficient immunogenic signalling. *Cell Death and Differentiation*, 21(1), 92–99.

- Kobayashi, T., Yan, H., Kurahashi, Y., Ito, Y., Maeda, H., Tada, T., ... Nakayama, J. (2013). Role of GalNAc4S-6ST in Astrocytic Tumor Progression. *PLoS ONE*, 8(1),
- Kondo, Y., Kanzawa, T., Sawaya, R., & Kondo, S. (2005). The role of autophagy in cancer development and response to therapy. *Nature Reviews. Cancer*, 5(9), 726–734.
- Koyama-Nasu, R., Haruta, R., Nasu-Nishimura, Y., Taniue, K., Katou, Y., Shirahige, K., ... Akiyama, T. (2014). The pleiotrophin-ALK axis is required for tumorigenicity of glioblastoma stem cells. *Oncogene*, 33(17), 2236–2244.
- Kreisl, T. N., Kim, L., Moore, K., Duic, P., Royce, C., Stroud, I., ... Fine, H. A. (2009). Phase II trial of single-agent bevacizumab followed by bevacizumab plus irinotecan at tumor progression in recurrent glioblastoma. *Journal of Clinical Oncology*, 27(5), 740–745.
- Kuo, A. H., Stoica, G. E., Riegel, A. T., & Wellstein, A. (2007). Recruitment of insulin receptor substrate-1 and activation of NF-kappaB essential for midkine growth signaling through anaplastic lymphoma kinase. *Oncogene*, 26(6), 859–869.
- Lacroix, M., Abi-Said, D., Fournay, D. R., Gokaslan, Z. L., Shi, W., DeMonte, F., ... Sawaya, R. (2001). A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *Journal of Neurosurgery*, 95(2), 190–198.
- Larsimont, J.-C., Youssef, K. K., Sánchez-Danés, A., Sukumaran, V., Defrance, M., Delatte, B., ... Blanpain, C. (2015). Sox9 Controls Self-Renewal of Oncogene Targeted Cells and Links Tumor Initiation and Invasion. *Cell Stem Cell*, 17(1), 60–73.
- Lathia, J., & Mack, S. (2015). Cancer stem cells in glioblastoma. *Genes & Development*, 29(12), 1203–1217.
- Lazova, R., Camp, R. L., Klump, V., Siddiqui, S. F., Amaravadi, R. K., & Pawelek, J. M. (2012). Punctate LC3B expression is a common feature of solid tumors and associated with proliferation, metastasis, and poor outcome. *Clinical Cancer Research*, 18(2), 370–379.
- Lee, J., Kotliarova, S., Kotliarov, Y., Li, A., Su, Q., Donin, N. M., ... Fine, H. A. (2006). Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell*, 9(5), 391–403.
- Lee, S. H., Suh, H. N., Lee, Y. J., Seo, B. N., Ha, J. W., & Han, H. J. (2012). Midkine prevented hypoxic injury of mouse embryonic stem cells through activation of Akt and HIF-1 α via low-density lipoprotein receptor-related protein-1. *Journal of Cellular Physiology*, 227(4), 1731–1739.
- Lee, Y., Scheck, A. C., Cloughesy, T. F., Lai, A., Dong, J., Farooqi, H. K., ... Nelson, S. F. (2008). Gene expression analysis of glioblastomas identifies the major molecular basis for the prognostic benefit of younger age. *BMC Medical Genomics*, 1(1), 52.

- Levy, J. M. M., Thompson, J. C., Griesinger, A. M., Amani, V., Donson, A. M., Birks, D. K., ... Thorburn, A. (2014). Autophagy inhibition improves chemosensitivity in BRAF(V600E) brain tumors. *Cancer Discovery*, 4(7), 773–780.
- Li, X., Wu, C., Chen, N., Gu, H., Yen, A., Cao, L., ... Wang, L. (2016). PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and targeted therapy for glioblastoma. *Oncotarget*, 7(22), 33440–33450.
- Li, X., Wu, X. Q., Deng, R., Li, D. D., Tang, J., Chen, W. D., ... Zhu, X. F. (2017). CaMKII-mediated Beclin 1 phosphorylation regulates autophagy that promotes degradation of Id and neuroblastoma cell differentiation. *Nature Communications*, 8(1).
- Li, Y.-Q., Chen, P., Haimovitz-Friedman, A., Reilly, R. M., & Wong, C. S. (2003). Endothelial apoptosis initiates acute blood-brain barrier disruption after ionizing radiation. *Cancer Research*, 63(18), 5950–5956.
- Li, Y. S., Milner, P. G., Chauhan, a K., Watson, M. a, Hoffman, R. M., Kodner, C. M., ... Deuel, T. F. (1990). Cloning and expression of a developmentally regulated protein that induces mitogenic and neurite outgrowth activity. *Science*, 250(4988), 1690–1694.
- Liang, J., Shao, S. H., Xu, Z.-X., Hennessy, B., Ding, Z., Larrea, M., ... Mills, G. B. (2007). The energy sensing LKB1-AMPK pathway regulates p27kip1 phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis. *Nature Cell Biology*, 9(2), 218–224.
- Lin, C.-J., Lee, C.-C., Shih, Y.-L., Lin, C.-H., Wang, S.-H., Chen, T.-H., & Shih, C.-M. (2012). Inhibition of Mitochondria- and Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Autophagy Augments Temozolomide-Induced Apoptosis in Glioma Cells. *PLoS ONE*, 7(6), e38706.
- Ling, S., Chang, X., Schultz, L., Lee, T. K., Chaux, A., Marchionni, L., ... Berman, D. M. (2011). An EGFR-ERK-SOX9 signaling cascade links urothelial development and regeneration to cancer. *Cancer Research*, 71(11), 3812–3821.
- Lino, M. M., & Merlo, A. (2011). PI3Kinase signaling in glioblastoma. *Journal of Neuro-Oncology*, 103(3), 417–427.
- Liu, C., Liu, L., Chen, X., Cheng, J., Zhang, H., Shen, J., ... Qian, C. (2016). Sox9 regulates self-renewal and tumorigenicity by promoting symmetrical cell division of cancer stem cells in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 64(1), 117–129.
- Liu, H., He, Z., von Rütte, T., Yousefi, S., Hunger, R. E., & Simon, H.-U. (2013). Down-regulation of autophagy-related protein 5 (ATG5) contributes to the pathogenesis of early-stage cutaneous melanoma. *Science Translational Medicine*, 5(202), 202-123.
- Liu, H., Liu, Z., Jiang, B., Peng, R., Ma, Z., & Lu, J. (2015). SOX9 Overexpression Promotes Glioma Metastasis via Wnt/ β -Catenin Signaling. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 73(1), 205–212.

- Liu, N., Zhang, L., Wang, Z., Cheng, Y., Zhang, P., Wang, X., ... Tu, Y. (2017). MicroRNA-101 inhibits proliferation, migration and invasion of human glioblastoma by targeting SOX9. *Oncotarget*, 8(12), 19244–19254.
- Liu, X.-D., Yao, J., Tripathi, D. N., Ding, Z., Xu, Y., Sun, M., ... Jonasch, E. (2015). Autophagy mediates HIF2 α degradation and suppresses renal tumorigenesis. *Oncogene*, 34(19), 2450–2460.
- Lomonaco, S. L., Finniss, S., Xiang, C., Decarvalho, A., Umansky, F., Kalkanis, S. N., ... Brodie, C. (2009). The induction of autophagy by gamma-radiation contributes to the radioresistance of glioma stem cells. *International Journal of Cancer*, 125(3), 717–722.
- López-Valero, I., Torres, S., Salazar-Roa, M., García-Taboada, E., Hernández-Tiedra, S., Guzmán, M., ... Lorente, M. (2018a). Optimization of a preclinical therapy of cannabinoids in combination with temozolomide against glioma. *Biochemical Pharmacology*.
- López-Valero, I., Saiz-Ladera, C., Torres, S., Hernández-Tiedra, S., García-Taboada, E., Rodríguez-Fornés, F., ... Velasco, G. (2018b). Targeting Glioma Initiating Cells with a combined therapy of cannabinoids and temozolomide. *Biochemical Pharmacology*, 157, 266–274.
- Lorente, M., Carracedo, A., Torres, S., Natali, F., Egia, A., Hernández-Tiedra, S., ... Velasco, G. (2009). Amphiregulin is a factor for resistance of glioma cells to cannabinoid-induced apoptosis. *Glia*, 57(13), 1374–1385.
- Lorente, M., Torres, S., Salazar, M., Carracedo, A., Hernández-Tiedra, S., Rodríguez-Fornés, F., ... Velasco, G. (2011a). Stimulation of the midkine/ALK axis renders glioma cells resistant to cannabinoid antitumoral action. *Cell Death and Differentiation*, 18(6), 959–973.
- Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvett, A., ... Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathologica*, 114(2), 97–109.
- Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., ... Ellison, D. W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica*, 131(6), 803–820.
- Luanpitpong, S., Li, J., Manke, A., Brundage, K., Ellis, E., McLaughlin, S. L., ... Rojanasakul, Y. (2016). SLUG is required for SOX9 stabilization and functions to promote cancer stem cells and metastasis in human lung carcinoma. *Oncogene*, 35(22), 2824–2833.
- Luo, J., Wang, X., Xia, Z., Yang, L., Ding, Z., Chen, S., ... Zhang, N. (2015). Transcriptional factor specificity protein 1 (SP1) promotes the proliferation of glioma cells by up-regulating midkine (MDK). *Molecular Biology of the Cell*, 26(3), 430–439.

- Ma, J., Lang, B., Wang, X., Wang, L., Dong, Y., & Hu, H. (2014). Co-expression of midkine and pleiotrophin predicts poor survival in human glioma. *Journal of Clinical Neuroscience*, 21(11), 1885–1890.
- Maccarrone, M., & Wenger, T. (2005). Effects of cannabinoids on hypothalamic and reproductive function. *Handbook of Experimental Pharmacology*, (168), 555–571.
- Madhavan, S., Zenklusen, J.-C., Kotliarov, Y., Sahni, H., Fine, H. A., & Buetow, K. (2009). Rembrandt: helping personalized medicine become a reality through integrative translational research. *Molecular Cancer Research*, 7(2), 157–167.
- Maeda, N., Ichihara-Tanaka, K., Kimura, T., Kadomatsu, K., Muramatsu, T., & Noda, M. (1999). A receptor-like protein-tyrosine phosphatase PTPzeta/RPTPbeta binds a heparin-binding growth factor midkine. Involvement of arginine 78 of midkine in the high affinity binding to PTPzeta. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(18), 12474–12479.
- Marcu, J. P., Christian, R. T., Lau, D., Zielinski, A. J., Horowitz, M. P., Lee, J., ... McAllister, S. D. (2010). Cannabidiol Enhances the Inhibitory Effects of Δ^9 -Tetrahydrocannabinol on Human Glioblastoma Cell Proliferation and Survival. *Molecular Cancer Therapeutics*, 9(1), 180–189.
- Martini, S., Bernoth, K., Main, H., Ortega, G. D. C., Lendahl, U., Just, U., & Schwanbeck, R. (2013). A critical role for Sox9 in NOTCH-induced astroglialogenesis and stem cell maintenance. *Stem Cells*, 31(4), 741–751.
- Massi, P., Solinas, M., Cinquina, V., & Parolaro, D. (2013). Cannabidiol as potential anticancer drug. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 75(2), 303–312.
- Massi, P., Vaccani, A., Bianchessi, S., Costa, B., Macchi, P., & Parolaro, D. (2006). The non-psychoactive cannabidiol triggers caspase activation and oxidative stress in human glioma cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(17), 2057–2066.
- Masui, M., Okui, T., Shimo, T., Takabatake, K., Fukazawa, T., Matsumoto, K., ... Sasaki, A. (2016). Novel Midkine Inhibitor iMDK Inhibits Tumor Growth and Angiogenesis in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Anticancer Research*, 36(6), 2775–2781.
- Matheu, A., Collado, M., Wise, C., Manterola, L., Cekaite, L., Tye, A. J., ... Lovell-Badge, R. (2012). Oncogenicity of the Developmental Transcription Factor Sox9. *Cancer Research*, 72(5), 1301–1315.
- Mathew, R., Karp, C. M., Beaudoin, B., Vuong, N., Chen, G., Chen, H.-Y., ... White, E. (2009). Autophagy Suppresses Tumorigenesis through Elimination of p62. *Cell*, 137(6), 1062–1075.

- Matsuda, L. A., Lolait, S. J., Brownstein, M. J., Young, A. C., & Bonner, T. I. (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, 346(6284), 561–564.
- Matsui, T., Ichihara-Tanaka, K., Lan, C., Muramatsu, H., Kondou, T., Hirose, C., ... Muramatsu, T. (2010). Midkine inhibitors: application of a simple assay procedure to screening of inhibitory compounds. *International Archives of Medicine*, 3(1), 12.
- Maycotte, P., Gearheart, C. M., Barnard, R., Aryal, S., Mulcahy Levy, J. M., Fosmire, S. P., ... Thorburn, A. (2014). STAT3-mediated autophagy dependence identifies subtypes of breast cancer where autophagy inhibition can be efficacious. *Cancer Research*, 74(9), 2579–2590.
- McAllister, S. D., Christian, R. T., Horowitz, M. P., Garcia, A., & Desprez, P.-Y. (2007). Cannabidiol as a novel inhibitor of Id-1 gene expression in aggressive breast cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 6(11), 2921–2927.
- McAllister, S. D., Murase, R., Christian, R. T., Lau, D., Zielinski, A. J., Allison, J., ... Desprez, P.-Y. (2011). Pathways mediating the effects of cannabidiol on the reduction of breast cancer cell proliferation, invasion, and metastasis. *Breast Cancer Research and Treatment*, 129(1), 37–47.
- McKallip, R. J., Nagarkatti, M., & Nagarkatti, P. S. (2005). Delta-9-tetrahydrocannabinol enhances breast cancer growth and metastasis by suppression of the antitumor immune response. *Journal of Immunology*, 174(6), 3281–3289.
- McLendon, R., Friedman, A., Bigner, D., Van Meir, E. G., Brat, D. J., M. Mastrogiannis, G., ... Thomson, E. (2008). Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*, 455(7216), 1061–1068.
- Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N. E., Schatz, A. R., ... Compton, D. R. (1995). Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochemical Pharmacology*, 50(1), 83–90.
- Meng, Z., Tan, J., Zhang, G., Tian, W., Fu, Q., Li, W., ... Upadhyaya, A. (2015). Evaluation of serum midkine as a biomarker in differentiated thyroid cancer. *Life Sciences*, 130, 18–24.
- Mi, R., Chen, W., & Hoke, A. (2007). Pleiotrophin is a neurotrophic factor for spinal motor neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(11), 4664–4669.
- Michaud, M., Martins, I., Sukkurwala, A. Q., Adjemian, S., Ma, Y., Pellegatti, P., ... Kroemer, G. (2011). Autophagy-dependent anticancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice. *Science*, 334(6062), 1573–1577.

- Mikhaylova, O., Stratton, Y., Hall, D., Kellner, E., Ehmer, B., Drew, A. F., ... Czyzyk-Krzeska, M. F. (2012). VHL-Regulated MiR-204 Suppresses Tumor Growth through Inhibition of LC3B-Mediated Autophagy in Renal Clear Cell Carcinoma. *Cancer Cell*, 21(4), 532–546.
- Miller, J. J., Shih, H. A., Andronesi, O. C., & Cahill, D. P. (2017). Isocitrate dehydrogenase-mutant glioma: Evolving clinical and therapeutic implications. *Cancer*, 123(23), 4535–4546.
- Milner, P. G., Li, Y. S., Hoffman, R. M., Kodner, C. M., Siegel, N. R., & Deuel, T. F. (1989). A novel 17 kD heparin-binding growth factor (HBGF-8) in bovine uterus: Purification and N-terminal amino acid sequence. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 165(3), 1096–1103.
- Mimeault, M., Pommery, N., Wattez, N., Bailly, C., & Hénichart, J.-P. (2003). Anti-proliferative and apoptotic effects of anandamide in human prostatic cancer cell lines: implication of epidermal growth factor receptor down-regulation and ceramide production. *The Prostate*, 56(1), 1–12.
- Mirkin, B. L., Clark, S., Zheng, X., Chu, F., White, B. D., Greene, M., & Rebbaa, A. (2005). Identification of midkine as a mediator for intercellular transfer of drug resistance. *Oncogene*, 24(31), 4965–4974.
- Miyato, H., Kitayama, J., Yamashita, H., Souma, D., Asakage, M., Yamada, J., & Nagawa, H. (2009). Pharmacological Synergism Between Cannabinoids and Paclitaxel in Gastric Cancer Cell Lines. *Journal of Surgical Research*, 155(1), 40–47.
- Molina, E. S., Pillat, M. M., Moura-Neto, V., Lah, T. T., & Ulrich, H. (2014). Glioblastoma stem-like cells: approaches for isolation and characterization. *Journal of Cancer Stem Cell Research*, 1(1), 1.
- Moog-Lutz, C., Degoutin, J., Gouzi, J. Y., Frobert, Y., Carvalho, N. B., Bureau, J., ... Vigny, M. (2005). Activation and Inhibition of Anaplastic Lymphoma Kinase Receptor Tyrosine Kinase by Monoclonal Antibodies and Absence of Agonist Activity of Pleiotrophin. *Journal of Biological Chemistry*, 280(28), 26039–26048.
- Morelli, M. B., Offidani, M., Alesiani, F., Discepoli, G., Liberati, S., Olivieri, A., ... Nabissi, M. (2014). The effects of cannabidiol and its synergism with bortezomib in multiple myeloma cell lines. A role for transient receptor potential vanilloid type-2. *International Journal of Cancer*, 134(11), 2534–2546.
- Morris, S. W., Kirstein, M. N., Valentine, M. B., Dittmer, K. G., Shapiro, D. N., Saltman, D. L., & Look, A. T. (1994). Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science*, 263(5151), 1281–1284.

- Morris, S. W., Naeve, C., Mathew, P., James, P. L., Kirstein, M. N., Cui, X., & Witte, D. P. (1997). ALK, the chromosome 2 gene locus altered by the t(2;5) in non-Hodgkin's lymphoma, encodes a novel neural receptor tyrosine kinase that is highly related to leukocyte tyrosine kinase (LTK). *Oncogene*, 14(18), 2175–2188.
- Motegi, A., Fujimoto, J., Kotani, M., Sakuraba, H., & Yamamoto, T. (2004). ALK receptor tyrosine kinase promotes cell growth and neurite outgrowth. *Journal of Cell Science*, 117(15), 3319–3329.
- Munro, S., Thomas, K. L., & Abu-Shaar, M. (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, 365(6441), 61–65.
- Munson, A. E., Harris, L. S., Friedman, M. A., Dewey, W. L., & Carchman, R. A. (1975). Antineoplastic activity of cannabinoids. *Journal of the National Cancer Institute*, 55(3), 597–602.
- Muramatsu, T. (2002). Midkine and pleiotrophin: two related proteins involved in development, survival, inflammation and tumorigenesis. *Journal of Biochemistry*, 132(3), 359–371,
- Muramatsu, T. (2011). Midkine: a promising molecule for drug development to treat diseases of the central nervous system. *Current Pharmaceutical Design*, 17(5), 410–423.
- Muramatsu, T. (2014). Structure and function of midkine as the basis of its pharmacological effects. *British Journal of Pharmacology*, 171(4), 814–826.
- Murase, R., Kawamura, R., Singer, E., Pakdel, A., Sarma, P., Judkins, J., ... McAllister, S. D. (2014). Targeting multiple cannabinoid anti-tumour pathways with a resorcinol derivative leads to inhibition of advanced stages of breast cancer. *British Journal of Pharmacology*, 171(19), 4464–4477.
- Nabissi, M., Morelli, M. B., Amantini, C., Liberati, S., Santoni, M., Ricci-Vitiani, L., ... Santoni, G. (2015). Cannabidiol stimulates AML-1a-dependent glial differentiation and inhibits glioma stem-like cells proliferation by inducing autophagy in a TRPV2-dependent manner. *International Journal of Cancer*, 137(8), 1855–1869.
- Nabissi, M., Morelli, M. B., Santoni, M., & Santoni, G. (2013). Triggering of the TRPV2 channel by cannabidiol sensitizes glioblastoma cells to cytotoxic chemotherapeutic agents. *Carcinogenesis*, 34(1), 48–57.
- Nakamura, M., Shimada, K., Ishida, E., Nakase, H., & Konishi, N. (2007). Genetic analysis to complement histopathological diagnosis of brain tumors. *Histology and Histopathology*, 22(3), 327–335.

- Niesink, R. J. M., & van Laar, M. W. (2013). Does Cannabidiol Protect Against Adverse Psychological Effects of THC? *Frontiers in Psychiatry*, 4, 130.
- Nobata, S., Shinozawa, T., & Sakanishi, A. (2005). Truncated midkine induces transformation of cultured cells and short latency of tumorigenesis in nude mice. *Cancer Letters*, 219(1), 83–89.
- Ohuchida, T., Okamoto, K., Akahane, K., Higure, A., Todoroki, H., Abe, Y., ... Itoh, H. (2004). Midkine protects hepatocellular carcinoma cells against TRAIL-mediated apoptosis through down-regulation of caspase-3 activity. *Cancer*, 100(11), 2430–2436.
- Oldrini, B., Curiel-García, Á., Marques, C., Matia, V., Uluçkan, Ö., Graña-Castro, O., ... Squatrito, M. (2018). Somatic genome editing with the RCAS-TVA-CRISPR-Cas9 system for precision tumor modeling. *Nature Communications*, 9(1), 1466.
- Olmeda, D., Cerezo-Wallis, D., Riveiro-Falkenbach, E., Pennacchi, P. C., Contreras-Alcalde, M., Ibarz, N., ... Soengas, M. S. (2017). Whole-body imaging of lymphovascular niches identifies pre-metastatic roles of midkine. *Nature*, 546(7660), 676–680.
- Ostrom, Q. T., Bauchet, L., Davis, F. G., Deltour, I., Fisher, J. L., Langer, C. E., ... Barnholtz-Sloan, J. S. (2014). The epidemiology of glioma in adults: "a state of the science" review. *Neuro-Oncology*, 16(7), 896–913.
- Owada, K., Sanjo, N., Kobayashi, T., Mizusawa, H., Muramatsu, H., Muramatsu, T., & Michikawa, M. (1999). Midkine inhibits caspase-dependent apoptosis via the activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase in cultured neurons. *Journal of Neurochemistry*, 73(5), 2084–2092.
- Ozawa, T., Riester, M., Cheng, Y., Huse, J. T., Squatrito, M., Helmy, K., ... Holland, E. C. (2014). Most human non-GCIMP glioblastoma subtypes evolve from a common proneural-like precursor glioma. *Cancer Cell*, 26(2), 288–300.
- Palazuelos, J., Aguado, T., Egia, A., Mechoulam, R., Guzmán, M., & Galve-Roperh, I. (2006). Non-psychoactive CB2 cannabinoid agonists stimulate neural progenitor proliferation. *The FASEB Journal*, 20(13), 2405–2407.
- Palmer, R. H., Vernersson, E., Grabbe, C., & Hallberg, B. (2009). Anaplastic lymphoma kinase: signalling in development and disease. *The Biochemical Journal*, 420(3), 345–361.
- Parsons, D. W., Jones, S., Zhang, X., Lin, J. C.-H., Leary, R. J., Angenendt, P., ... Kinzler, K. W. (2008). An Integrated Genomic Analysis of Human Glioblastoma Multiforme. *Science*, 321(5897), 1807–1812.
- Pasquier, B. (2016). Autophagy inhibitors. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(5), 985–1001.

- Pearson, J. R. D., & Regad, T. (2017). Targeting cellular pathways in glioblastoma multiforme. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2, 17040.
- Peng, Y.-F., Shi, Y.-H., Ding, Z.-B., Ke, A.-W., Gu, C.-Y., Hui, B., ... Fan, J. (2013). Autophagy inhibition suppresses pulmonary metastasis of HCC in mice via impairing anoikis resistance and colonization of HCC cells. *Autophagy*, 9(12), 2056–2068.
- Perez-Pinera, P., Zhang, W., Chang, Y., Vega, J. A., & Deuel, T. F. (2007). Anaplastic lymphoma kinase is activated through the pleiotrophin/receptor protein-tyrosine phosphatase beta/zeta signaling pathway: an alternative mechanism of receptor tyrosine kinase activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(39), 28683–28690.
- Pertwee, R. G. (2009). Emerging strategies for exploiting cannabinoid receptor agonists as medicines. *British Journal of Pharmacology*, 156(3), 397–411.
- Pertwee, R. G., Howlett, A. C., Abood, M. E., Alexander, S. P. H., Di Marzo, V., Elphick, M. R., ... Ross, R. A. (2010). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB₁ and CB₂. *Pharmacological Reviews*, 62(4), 588–631.
- Petherick, K. J., Williams, A. C., Lane, J. D., Ordo, P., Huelsken, J., Collard, T. J., ... Greenhough, A. (2013). Autolysosomal β -catenin degradation regulates Wnt-autophagy-p62 crosstalk. *The EMBO Journal*, 32(13): 1903-1916.
- Pirtoli, L., Cevenini, G., Tini, P., Vannini, M., Oliveri, G., Marsili, S., ... Miracco, C. (2009). The prognostic role of Beclin 1 protein expression in high-grade gliomas. *Autophagy*, 5(7), 930–936.
- Pisanti, S., Borselli, C., Oliviero, O., Laezza, C., Gazerro, P., & Bifulco, M. (2007). Antiangiogenic activity of the endocannabinoid anandamide: correlation to its tumor-suppressor efficacy. *Journal of Cellular Physiology*, 211(2), 495–503.
- Powers, C., Aigner, A., Stoica, G. E., McDonnell, K., & Wellstein, A. (2002). Pleiotrophin signaling through anaplastic lymphoma kinase is rate-limiting for glioblastoma growth. *Journal of Biological Chemistry*, 277(16), 14153–14158.
- Pozo, N., Zahonero, C., Fernández, P., Liñares, J. M., Ayuso, A., Hagiwara, M., ... Sánchez-Gómez, P. (2013). Inhibition of DYRK1A destabilizes EGFR and reduces EGFR-dependent glioblastoma growth. *Journal of Clinical Investigation*, 123(6), 2475–2487.
- Preet, A., Ganju, R. K., & Groopman, J. E. (2008). Delta9-Tetrahydrocannabinol inhibits epithelial growth factor-induced lung cancer cell migration in vitro as well as its growth and metastasis in vivo. *Oncogene*, 27(3), 339–346.

REFERENCIAS

- Qamri, Z., Preet, A., Nasser, M. W., Bass, C. E., Leone, G., Barsky, S. H., & Ganju, R. K. (2009). Synthetic cannabinoid receptor agonists inhibit tumor growth and metastasis of breast cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 8(11), 3117–3129.
- Qu, X., Yu, J., Bhagat, G., Furuya, N., Hibshoosh, H., Troxel, A., ... Levine, B. (2003). Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *The Journal of Clinical Investigation*, 112(12), 1809–1820.
- Ramer, R., Heinemann, K., Merkord, J., Rohde, H., Salamon, A., Linnebacher, M., & Hinz, B. (2013). COX-2 and PPAR- γ confer cannabidiol-induced apoptosis of human lung cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 12(1), 69–82.
- Ramer, R., Fischer, S., Haustein, M., Manda, K., & Hinz, B. (2014). Cannabinoids inhibit angiogenic capacities of endothelial cells via release of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 from lung cancer cells. *Biochemical Pharmacology*, 91(2), 202–216.
- Rao, G., Pedone, C. A., Valle, L. Del, Reiss, K., Holland, E. C., & Fults, D. W. (2004). Sonic hedgehog and insulin-like growth factor signaling synergize to induce medulloblastoma formation from nestin-expressing neural progenitors in mice. *Oncogene*, 23(36), 6156–6162.
- Rao, S., Tortola, L., Perlot, T., Wirnsberger, G., Novatchkova, M., Nitsch, R., ... Penninger, J. M. (2014). A dual role for autophagy in a murine model of lung cancer. *Nature Communications*, 5(1), 3056.
- Rauvala, H. (1989). An 18-kd heparin-binding protein of developing brain that is distinct from fibroblast growth factors. *The EMBO Journal*, 8(10), 2933–2941.
- Rawnaq, T., Dietrich, L., Wolters-Eisfeld, G., Uzunoglu, F. G., Vashist, Y. K., Bachmann, K., ... Güngör, C. (2014). The multifunctional growth factor midkine promotes proliferation and migration in pancreatic cancer. *Molecular Cancer Research*, 12(5), 670–680.
- Rebbaa, A., Chou, P. M., & Mirkin, B. L. (2001). Factors secreted by human neuroblastoma mediated doxorubicin resistance by activating STAT3 and inhibiting apoptosis. *Molecular Medicine*, 7(6), 393–400.
- Reiff, T., Huber, L., Kramer, M., Delattre, O., Janoueix-Lerosey, I., & Rohrer, H. (2011). Midkine and Alk signaling in sympathetic neuron proliferation and neuroblastoma predisposition. *Development*, 138(21), 4699–4708.
- Ren, H., Tan, Z.-P., Zhu, X., Crosby, K., Haack, H., Ren, J.-M., ... Comb, M. J. (2012). Identification of Anaplastic Lymphoma Kinase as a Potential Therapeutic Target in Ovarian Cancer. *Cancer Research*, 72(13), 3312–3323.
- Reynolds, P. R., Mucenski, M. L., Cras, T. D. Le, Nichols, W. C., & Whitsett, J. A. (2004). Midkine Is Regulated by Hypoxia and Causes Pulmonary Vascular Remodeling , 279(35), 37124–32.

- Riemenschneider, M. J., & Reifenberger, G. (2009). Molecular neuropathology of gliomas. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(1), 184–212.
- Ropolo, M., Daga, A., Griffero, F., Foresta, M., Casartelli, G., Zunino, A., ... Frosina, G. (2009). Comparative analysis of DNA repair in stem and nonstem glioma cell cultures. *Molecular Cancer Research : MCR*, 7(3), 383–392.
- Rosenfeld, M. R., Ye, X., Supko, J. G., Desideri, S., Grossman, S. A., Brem, S., ... Amaravadi, R. K. (2014). A phase I/II trial of hydroxychloroquine in conjunction with radiation therapy and concurrent and adjuvant temozolomide in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme. *Autophagy*, 10(8), 1359–1368.
- Rosenfeldt, M. T., O'Prey, J., Morton, J. P., Nixon, C., MacKay, G., Mrowinska, A., ... Ryan, K. M. (2013). p53 status determines the role of autophagy in pancreatic tumour development. *Nature*, 504(7479), 296–300.
- Rothenstein, J. M., & Chooback, N. (2018). ALK inhibitors, resistance development, clinical trials. *Current Oncology*, 25(Suppl 1), 59.
- Sakaguchi, N., Muramatsu, H., Ichihara-Tanaka, K., Maeda, N., Noda, M., Yamamoto, T., ... Muramatsu, T. (2003). Receptor-type protein tyrosine phosphatase zeta as a component of the signaling receptor complex for midkine-dependent survival of embryonic neurons. *Neuroscience Research*, 45(2), 219–224.
- Sakamoto, K., & Kadomatsu, K. (2012). Midkine in the pathology of cancer, neural disease, and inflammation. *Pathology International*, 62(7), 445–455.
- Salama, R. H. M., Muramatsu, H., Zou, P., Okayama, M., & Muramatsu, T. (2006). Midkine, a heparin-binding growth factor, produced by the host enhances metastasis of Lewis lung carcinoma cells. *Cancer Letters*, 233(1), 16–20.
- Salazar, M., Carracedo, A., Salanueva, Í. J., Hernández-tiedra, S., Lorente, M., Egia, A., ... Velasco, G. (2009). Cannabinoid action induces autophagy- mediated cell death through stimulation of ER stress in human glioma cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(5), 1359–1372.
- Salazar, M., Lorente, M., García-Taboada, E., Pérez Gómez, E., Dávila, D., Zúñiga-García, P., ... Velasco, G. (2015). Loss of Tribbles pseudokinase-3 promotes Akt-driven tumorigenesis via FOXO inactivation. *Cell Death and Differentiation*, 22(1), 131–144.
- Sanai, N., Alvarez-Buylla, A., & Berger, M. S. (2005). Neural Stem Cells and the Origin of Gliomas. *New England Journal of Medicine*, 353(8), 811–822.
- Sánchez, C., de Ceballos, M. L., Gomez del Pulgar, T., Rueda, D., Corbacho, C., Velasco, G., ... Guzmán, M. (2001). Inhibition of glioma growth in vivo by selective activation of the CB(2) cannabinoid receptor. *Cancer Research*, 61(15), 5784–5789.

- Sánchez, M. G., Ruiz-Llorente, L., Sánchez, A. M., & Díaz-Laviada, I. (2003). Activation of phosphoinositide 3-kinase/PKB pathway by CB(1) and CB(2) cannabinoid receptors expressed in prostate PC-3 cells. Involvement in Raf-1 stimulation and NGF induction. *Cellular Signalling*, 15(9), 851–859.
- Santos, J. C., Carrasco-Garcia, E., Garcia-Puga, M., Aldaz, P., Montes, M., Fernandez-Reyes, M., ... Matheu, A. (2016). SOX9 Elevation Acts with Canonical WNT Signaling to Drive Gastric Cancer Progression. *Cancer Research*, 76(22), 6735–6746.
- Sato, W., Kadomatsu, K., Yuzawa, Y., Muramatsu, H., Hotta, N., Matsuo, S., & Muramatsu, T. (2001). Midkine is involved in neutrophil infiltration into the tubulointerstitium in ischemic renal injury. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 167(6), 3463–3469.
- Saunders, N. R., Ek, C. J., Habgood, M. D., & Dziegielewska, K. M. (2008). Barriers in the brain: a renaissance? *Trends in Neurosciences*, 31(6), 279–286.
- Scott, C. E., Wynn, S. L., Sesay, A., Cruz, C., Cheung, M., Gomez Gavira, M.-V., ... Briscoe, J. (2010). SOX9 induces and maintains neural stem cells. *Nature Neuroscience*, 13(10), 1181–1189.
- Scott, K. A., Dalglish, A. G., & Liu, W. M. (2014). The Combination of Cannabidiol and Δ9-Tetrahydrocannabinol Enhances the Anticancer Effects of Radiation in an Orthotopic Murine Glioma Model. *Molecular Cancer Therapeutics*, 13(12), 2955–2967.
- Seidler, B., Schmidt, A., Mayr, U., Nakhai, H., Schmid, R. M., Schneider, G., & Saur, D. (2008). A Cre-loxP-based mouse model for conditional somatic gene expression and knockdown in vivo by using avian retroviral vectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(29), 10137–10142.
- Shaw, A. T., Friboulet, L., Leshchiner, I., Gainor, J. F., Bergqvist, S., Brooun, A., ... Engelman, J. A. (2016). Resensitization to Crizotinib by the Lorlatinib ALK Resistance Mutation L1198F. *New England Journal of Medicine*, 374(1), 54–61.
- She, Z.-Y., & Yang, W.-X. (2015). SOX family transcription factors involved in diverse cellular events during development. *European Journal of Cell Biology*, 94(12), 547–563.
- Sherry, M. M., Reeves, A., Wu, J. K., & Cochran, B. H. (2009). STAT3 is required for proliferation and maintenance of multipotency in glioblastoma stem cells. *Stem Cells*, 27(10), 2383–2392.
- Shibata, Y., Muramatsu, T., Hirai, M., Inui, T., Kimura, T., Saito, H., ... Kadomatsu, K. (2002). Nuclear targeting by the growth factor midkine. *Molecular and Cellular Biology*, 22(19), 6788–6796.
- Shih, A. H., Dai, C., Hu, X., Rosenblum, M. K., Koutcher, J. A., & Holland, E. C. (2004). Dose-dependent effects of platelet-derived growth factor-B on glial tumorigenesis. *Cancer Research*, 64(14), 4783–4789.

- Sinclair, A. H., Berta, P., Palmer, M. S., Hawkins, J. R., Griffiths, B. L., Smith, M. J., ... Goodfellow, P. N. (1990). A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*, 346(6281), 240–244.
- Singer, E., Judkins, J., Salomonis, N., Matlaf, L., Soteropoulos, P., McAllister, S., & Soroceanu, L. (2015). Reactive oxygen species-mediated therapeutic response and resistance in glioblastoma. *Cell Death and Disease*, 6(1), e1601-11.
- Singh, S. K., Hawkins, C., Clarke, I. D., Squire, J. A., Bayani, J., Hide, T., ... Dirks, P. B. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*, 432(7015), 396–401.
- Singh, S. S., Vats, S., Chia, A. Y.-Q., Tan, T. Z., Deng, S., Ong, M. S., ... Kumar, A. P. (2018). Dual role of autophagy in hallmarks of cancer. *Oncogene*, 37(9), 1142–1158.
- Solinas, M., Massi, P., Cantelmo, A. R., Cattaneo, M. G., Cammarota, R., Bartolini, D., ... Parolaro, D. (2012). Cannabidiol inhibits angiogenesis by multiple mechanisms. *British Journal of Pharmacology*, 167(6), 1218–1231.
- Solinas, M., Massi, P., Cinquina, V., Valenti, M., Bolognini, D., Gariboldi, M., ... Parolaro, D. (2013). Cannabidiol, a Non-Psychoactive Cannabinoid Compound, Inhibits Proliferation and Invasion in U87-MG and T98G Glioma Cells through a Multitarget Effect. *PLoS ONE*, 8(10), e76918.
- Solomon, B. J., Besse, B., Bauer, T. M., Felip, E., Soo, R. A., Camidge, D. R., ... Shaw, A. T. (2018). Lorlatinib in patients with ALK-positive non-small-cell lung cancer: results from a global phase 2 study. *The Lancet Oncology*, 19(12), 1654–1667.
- Soroceanu, L., Murase, R., Limbad, C., Singer, E., Allison, J., Adrados, I., ... McAllister, S. D. (2013). Id-1 is a key transcriptional regulator of glioblastoma aggressiveness and a novel therapeutic target. *Cancer Research*, 73(5), 1559–1569.
- Sorrelle, N., Dominguez, A. T. A., & Brekken, R. A. (2017). From top to bottom: midkine and pleiotrophin as emerging players in immune regulation. *Journal of Leukocyte Biology*, 102(2), 277–286.
- Spencer, D. A., Auffinger, B. M., Murphy, J. P., Muroski, M. E., Qiao, J., Gorind, Y., & Lesniak, M. S. (2017). Hitting a Moving Target: Glioma Stem Cells Demand New Approaches in Glioblastoma Therapy. *Current Cancer Drug Targets*, 17(3), 236–254.
- Spinello, I., Saulle, E., Quaranta, M. T., Pasquini, L., Pelosi, E., Castelli, G., ... Labbaye, C. (2018). The small-molecule compound AC-73 targeting CD147 inhibits leukemic cell proliferation, induces autophagy and increases the chemotherapeutic sensitivity of acute myeloid leukemia cells.199661.

- Squatrito, M., Brennan, C. W., Helmy, K., Huse, J. T., Petrini, J. H., & Holland, E. C. (2010). Loss of ATM/Chk2/p53 pathway components accelerates tumor development and contributes to radiation resistance in gliomas. *Cancer Cell*, 18(6), 619–629.
- Stoica, G. E., Kuo, A., Aigner, A., Sunitha, I., Souttou, B., Malerczyk, C., ... Wellstein, A. (2001). Identification of Anaplastic Lymphoma Kinase as a Receptor for the Growth Factor Pleiotrophin. *The Journal of Biological Chemistry*, 276 (20), 16772-16779.
- Stoica, G. E., Kuo, A., Powers, C., Bowden, E. T., Sale, E. B., Riegel, A. T., & Wellstein, A. (2002). Midkine binds to anaplastic lymphoma kinase (ALK) and acts as a growth factor for different cell types. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(39), 35990–35998.
- Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J. B., ... National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. (2005). Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *New England Journal of Medicine*, 352(10), 987–996.
- Stupp, R., Taillibert, S., Kanner, A., Read, W., Steinberg, D. M., Lhermitte, B., ... Ram, Z. (2017). Effect of Tumor-Treating Fields Plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patients With Glioblastoma. *JAMA*, 318(23), 2306.
- Stylianou, D. C., Auf der Maur, A., Kodack, D. P., Henke, R. T., Hohn, S., Toretsky, J. A., ... Wellstein, A. (2009). Effect of single-chain antibody targeting of the ligand-binding domain in the anaplastic lymphoma kinase receptor. *Oncogene*, 28(37), 3296–3306.
- Stylli, S. S., Luwor, R. B., Ware, T. M. B., Tan, F., & Kaye, A. H. (2015). Mouse models of glioma. *Journal of Clinical Neuroscience*, 22(4), 619–626.
- Sueyoshi, T., Jono, H., Shinriki, S., Ota, K., Ota, T., Tasaki, M., ... Ando, Y. (2012). Therapeutic approaches targeting midkine suppress tumor growth and lung metastasis in osteosarcoma. *Cancer Letters*, 316(1), 23–30.
- Sun, B., Hu, C., Yang, Z., Zhang, X., Zhao, L., Xiong, J., ... Yin, Z. (2017). Midkine promotes hepatocellular carcinoma metastasis by elevating anoikis resistance of circulating tumor cells. *Oncotarget*, 8(20), 32523–32535.
- Suryo Rahmanto, A., Savov, V., Brunner, A., Bolin, S., Weishaupt, H., Malyukova, A., ... Sangfelt, O. (2016). FBW7 suppression leads to SOX9 stabilization and increased malignancy in medulloblastoma. *The EMBO Journal*, 35(20), 2192–2212.
- Suvà, M. L., Rheinbay, E., Gillespie, S. M., Patel, A. P., Wakimoto, H., Rabkin, S. D., ... Bernstein, B. E. (2014). Reconstructing and reprogramming the tumor-propagating potential of glioblastoma stem-like cells. *Cell*, 157(3), 580–594.

- Suzuki, N., Shibata, Y., Urano, T., Murohara, T., Muramatsu, T., & Kadomatsu, K. (2004). Proteasomal Degradation of the Nuclear Targeting Growth Factor Midkine. *Journal of Biological Chemistry*, 279(17), 17785–17791.
- Swartling, F. J., Ferletta, M., Kastemar, M., Weiss, W. A., & Westermarck, B. (2009). Cyclic GMP-dependent protein kinase II inhibits cell proliferation, Sox9 expression and Akt phosphorylation in human glioma cell lines. *Oncogene*, 28(35), 3121–3131.
- Swartling, F. J., Savov, V., Persson, A. I., Chen, J., Hackett, C. S., Northcott, P. A., ... Weiss, W. A. (2012). Distinct neural stem cell populations give rise to disparate brain tumors in response to N-MYC. *Cancer Cell*, 21(5), 601–613.
- Tagscherer, K. E., Fassl, A., Campos, B., Farhadi, M., Kraemer, A., Böck, B. C., ... Roth, W. (2008). Apoptosis-based treatment of glioblastomas with ABT-737, a novel small molecule inhibitor of Bcl-2 family proteins. *Oncogene*, 27(52), 6646–6656.
- Takamura, A., Komatsu, M., Hara, T., Sakamoto, A., Kishi, C., Waguri, S., ... Mizushima, N. (2011). Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Genes & Development*, 25(8),
- Takei, Y., Kadomatsu, K., Muramatsu, T., Matsuo, S., Itoh, H., Nakazawa, K., & Kubota, S. (2001). Antisense oligodeoxynucleotide targeted to midkine, a heparin-binding growth factor, suppresses tumorigenicity of mouse rectal carcinoma cells. *Cancer Research*, 61(23), 8486–8491.
- Tao, Z., Li, T., Ma, H., Yang, Y., Zhang, C., Hai, L., ... Yang, X. (2018). Autophagy suppresses self-renewal ability and tumorigenicity of glioma-initiating cells and promotes Notch1 degradation. *Cell Death & Disease*, 9(11), 1063.
- Tchougounova, E., Kastemar, M., Bråsäter, D., Holland, E. C., Westermarck, B., & Uhrbom, L. (2007). Loss of Arf causes tumor progression of PDGFB-induced oligodendroglioma. *Oncogene*, 26(43), 6289–6296.
- Tekirdag, K., & Cuervo, A. M. (2018). Chaperone-mediated autophagy and endosomal microautophagy: Joint by a chaperone. *Journal of Biological Chemistry*, 293(15), 5414–5424.
- Thomsen, M. K., Ambrosine, L., Wynn, S., Cheah, K. S. E., Foster, C. S., Fisher, G., ... Transatlantic Prostate Group. (2010). SOX9 elevation in the prostate promotes proliferation and cooperates with PTEN loss to drive tumor formation. *Cancer Research*, 70(3), 979–987.
- Tian, W., Shen, J., & Chen, W. (2017). Suppression of midkine gene promotes the antitumoral effect of cisplatin on human gastric cancer cell line AGS in vitro and in vivo via the modulation of Notch signaling pathway. *Oncology Reports*, 38(2), 745–754.

- Tong, Y., Mentlein, R., Buhl, R., Hugo, H.-H., Krause, J., Mehdorn, H. M., & Held-Feindt, J. (2007). Overexpression of midkine contributes to anti-apoptotic effects in human meningiomas. *Journal of Neurochemistry*, 100(4), 1097–1107.
- Torres, S., Lorente, M., Rodriguez-Fornes, F., Hernandez-Tiedra, S., Salazar, M., Garcia-Taboada, E., ... Velasco, G. (2011). A Combined Preclinical Therapy of Cannabinoids and Temozolomide against Glioma. *Molecular Cancer Therapeutics*, 10(1), 90–103.
- Ueoka, C., Kaneda, N., Okazaki, I., Nadanaka, S., Muramatsu, T., & Sugahara, K. (2000). Neuronal Cell Adhesion, Mediated by the Heparin-binding Neuroregulatory Factor Midkine, Is Specifically Inhibited by Chondroitin Sulfate E. *Journal of Biological Chemistry*, 275(48), 37407–37413.
- Ulasov, I. V., Nandi, S., Dey, M., Sonabend, A. M., & Lesniak, M. S. (2011). Inhibition of Sonic hedgehog and Notch pathways enhances sensitivity of CD133(+) glioma stem cells to temozolomide therapy. *Molecular Medicine*, 17(1–2), 103–112.
- Umehara, Y., Yamada, S., Nishimura, S., Shioi, J., Robakis, N. K., & Sugahara, K. (2004). Chondroitin sulfate of appican, the proteoglycan form of amyloid precursor protein, produced by C6 glioma cells interacts with heparin-binding neuroregulatory factors. *FEBS Letters*, 557(1–3), 233–238.
- Van Meir, EG., Hadjipanayis, CG., Norden, AD., Shu, HK., Wen, PY., & Olson, JJ. (2010) *Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma*, 60(3):166–193.
- Van Vulpen, M., Kal, H. B., Taphoorn, M. J. B., & El-Sharouni, S. Y. (2002). Changes in blood-brain barrier permeability induced by radiotherapy: implications for timing of chemotherapy? *Oncology Reports*, 9(4), 683–688.
- Velasco, G., Sánchez, C., & Guzmán, M. (2012). Towards the use of cannabinoids as antitumour agents. *Nature Reviews. Cancer*, 12(6), 436–444.
- Verhaak, R. G. W., Hoadley, K. A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M. D., ... Hayes, D. N. (2010). Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*, 17(1), 98–110.
- Vernersson, E., Khoo, N. K. S., Henriksson, M. L., Roos, G., Palmer, R. H., & Hallberg, B. (2006). Characterization of the expression of the ALK receptor tyrosine kinase in mice. *Gene Expression Patterns*, 6(5), 448–461.
- Vervoort, V. S., Lu, M., Valencia, F., Lesperance, J., Breier, G., Oshima, R., & Pasquale, E. B. (2008). A novel Flk1-TVA transgenic mouse model for gene delivery to angiogenic vasculature. *Transgenic Research*, 17(3), 403–415.

- Vescovi, A. L., Galli, R., & Reynolds, B. A. (2006). Brain tumour stem cells. *Nature Reviews Cancer*, 6(6), 425–436.
- Vitale, I., Manic, G., Dandrea, V., & De Maria, R. (2015). Role of autophagy in the maintenance and function of cancer stem cells. *International Journal of Developmental Biology*, 59(1–3), 95–108.
- Wang, J., Wakeman, T. P., Lathia, J. D., Hjelmeland, A. B., Wang, X.-F., White, R. R., ... Sullenger, B. A. (2010). Notch promotes radioresistance of glioma stem cells. *Stem Cells*, 28(1), 17–28.
- Wang, L., He, S., Yuan, J., Mao, X., Cao, Y., Zong, J., ... Zhang, Y. (2012). Oncogenic role of SOX9 expression in human malignant glioma. *Medical Oncology*, 29(5), 3484–3490.
- Wang, Q., Huang, Y., Ni, Y., Wang, H., & Hou, Y. (2007). siRNA targeting midkine inhibits gastric cancer cells growth and induces apoptosis involved caspase-3,8,9 activation and mitochondrial depolarization. *Journal of Biomedical Science*, 14(6), 783–795.
- Wasik, A. M., Almestrand, S., Wang, X., Hultenby, K., Dackland, Å.-L., Andersson, P., ... Sander, B. (2011). WIN55,212-2 induces cytoplasmic vacuolation in apoptosis-resistant MCL cells. *Cell Death & Disease*, 2(11), e225.
- Weckbach, L. T., Groesser, L., Borgolte, J., Pagel, J.-I., Pogoda, F., Schymeinsky, J., ... Walzog, B. (2012). Midkine acts as proangiogenic cytokine in hypoxia-induced angiogenesis. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 303(4), 429–38.
- Weckbach, L. T., Gola, A., Winkelmann, M., Jakob, S. M., Groesser, L., Borgolte, J., ... Walzog, B. (2014). The cytokine midkine supports neutrophil trafficking during acute inflammation by promoting adhesion via 2 integrins (CD11/CD18). *Blood*, 123(12), 1887–1896.
- Wellstein, A. (2012). ALK receptor activation, ligands and therapeutic targeting in glioblastoma and in other cancers. *Frontiers in Oncology*, 2, 1–9.
- Werder, A. Von, Seidler, B., Schmid, R. M., Schneider, G., & Saur, D. (2012). Production of avian retroviruses and tissue-specific somatic retroviral gene transfer in vivo using the RCAS/TVA system. *Nature Protocols*, 7(6), 1168–1183.
- Westphal, M., Hilt, D. C., Bortey, E., Delavault, P., Olivares, R., Warnke, P. C., ... Ram, Z. (2003). A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma. *Neuro-Oncology*, 5(2), 79–88.
- Wiesner, T., Lee, W., Obenaus, A. C., Ran, L., Murali, R., Zhang, Q. F., ... Chi, P. (2015). Alternative transcription initiation leads to expression of a novel ALK isoform in cancer. *Nature*, 526(7573), 453–457.

REFERENCIAS

- Wu, D., Liu, L., Yan, X., Wang, C., Wang, Y., Han, K., ... Min, D. (2017). Pleiotrophin promotes chemoresistance to doxorubicin in osteosarcoma by upregulating P-glycoprotein. *Oncotarget*, 8(38), 63857–63870.
- Wu, W., Schecker, J., Würstle, S., Schneider, F., Schönfelder, M., & Schlegel, J. (2018). Aldehyde dehydrogenase 1A3 (ALDH1A3) is regulated by autophagy in human glioblastoma cells. *Cancer Letters*, 417, 112–123.
- Wu, X., Fleming, A., Ricketts, T., Pavel, M., Virgin, H., Menzies, F. M., & Rubinsztein, D. C. (2016). Autophagy regulates Notch degradation and modulates stem cell development and neurogenesis. *Nature Communications*, 7, 10533.
- Würstle, S., Schneider, F., Ringel, F., Gempt, J., Lämmer, F., Delbridge, C., ... Schlegel, J. (2017). Temozolomide induces autophagy in primary and established glioblastoma cells in an EGFR independent manner. *Oncology Letters*, 14(1), 322–328.
- Xia, X., Lu, J.-J., Zhang, S.-S., Su, C.-H., & Luo, H.-H. (2016). Midkine is a serum and urinary biomarker for the detection and prognosis of non-small cell lung cancer. *Oncotarget*, 7(52), 87462–87472.
- Xu, X., Wang, Z., Liu, N., Cheng, Y., Jin, W., Zhang, P., ... Tu, Y. (2018). Association between SOX9 and CA9 in glioma, and its effects on chemosensitivity to TMZ. *International Journal of Oncology*, 53(1), 189–202.
- Xu, Y., Qu, X., Zhang, X., Luo, Y., Zhang, Y., Luo, Y., ... Liu, Y. (2009). Midkine positively regulates the proliferation of human gastric cancer cells. *Cancer Letters*, 279(2), 137–144.
- Yamashita, T., Shimada, H., Tanaka, S., Araki, K., Tomifuji, M., Mizokami, D., ... Shiotani, A. (2016). Serum midkine as a biomarker for malignancy, prognosis, and chemosensitivity in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Medicine*, 5(3), 415–425.
- Yamazaki, S., Lam, J. L., Zou, H. Y., Wang, H., Smeal, T., & Vicini, P. (2014). Translational pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling for an orally available novel inhibitor of anaplastic lymphoma kinase and c-Ros oncogene 1. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 351(1), 67–76.
- Yanagisawa, H., Komuta, Y., Kawano, H., Toyoda, M., & Sango, K. (2010). Pleiotrophin induces neurite outgrowth and up-regulates growth-associated protein (GAP)-43 mRNA through the ALK/GSK3beta/beta-catenin signaling in developing mouse neurons. *Neuroscience Research*, 66(1), 111–116.
- Yang, L.-J., Zhou, C.-F., & Lin, Z.-X. (2014). Temozolomide and Radiotherapy for Newly Diagnosed Glioblastoma Multiforme: A Systematic Review. *Cancer Investigation*, 32(2), 31–36.

- Yao, X., Tan, Z., Gu, B., Wu, R., Liu, Y., Dai, L., & Zhang, M. (2010). Promotion of self-renewal of embryonic stem cells by midkine. *Acta Pharmacologica Sinica*, 31(5), 629–637.
- Ye, F., Zhang, Y., Liu, Y., Yamada, K., Tso, J. L., Menjivar, J. C., ... Tso, C.-L. (2013). Protective properties of radio-chemoresistant glioblastoma stem cell clones are associated with metabolic adaptation to reduced glucose dependence. *PloS One*, 8(11), e80397.
- Zaffagnini, G., & Martens, S. (2016). Mechanisms of Selective Autophagy. *Journal of Molecular Biology*, 428(9 Pt A), 1714–1724.
- Zbinden, M., Duquet, A., Lorente-Trigos, A., Ngwabyt, S.-N., Borges, I., & Ruiz i Altaba, A. (2010). NANOG regulates glioma stem cells and is essential in vivo acting in a cross-functional network with GLI1 and p53. *The EMBO Journal*, 29(15), 2659–2674.
- Zeng, M., & Zhou, J.-N. (2008). Roles of autophagy and mTOR signaling in neuronal differentiation of mouse neuroblastoma cells. *Cellular Signalling*, 20(4), 659–665.
- Zhang, D., Ding, L., Li, Y., Ren, J., Shi, G., Wang, Y., ... Hou, Y. (2017). Midkine derived from cancer-associated fibroblasts promotes cisplatin-resistance via up-regulation of the expression of lncRNA ANRIL in tumour cells. *Scientific Reports*, 7(1), 1–11.
- Zhang, I., Zaorsky, N. G., Palmer, J. D., Mehra, R., & Lu, B. (2015). Targeting brain metastases in ALK-rearranged non-small-cell lung cancer. *The Lancet Oncology* 16(13), e510-21.
- Zhang, J., Stevens, M. F. G., & Bradshaw, T. D. (2012). Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance. *Current Molecular Pharmacology*, 5(1), 102–114.
- Zhang, J., Hummersone, M., Matthews, C. S., Stevens, M. F. G., & Bradshaw, T. D. (2015). N3-substituted temozolomide analogs overcome methylguanine-DNA methyltransferase and mismatch repair precipitating apoptotic and autophagic cancer cell death. *Oncology*, 88(1), 28–48.
- Zhang, L., Laaniste, L., Jiang, Y., Alafuzoff, I., Uhrbom, L., Dimberg, A., ... Dimberg, A. (2015). Pleiotrophin enhances PDGFB-induced gliomagenesis through increased proliferation of neural progenitor cells. *Oncotarget*, 7(49), 80382–80390.
- Zhang, S., Luo, X., Wan, F., & Lei, T. (2012). The Roles of Hypoxia-Inducible Factors in Regulating Neural Stem Cells Migration to Glioma Stem Cells and Determinating Their Fates. *Neurochemical Research*, 37(12), 2659–2666.
- Zhao, G., Nie, Y., Lv, M., He, L., Wang, T., & Hou, Y. (2012). ERβ-Mediated Estradiol Enhances Epithelial Mesenchymal Transition of Lung Adenocarcinoma through Increasing Transcription of Midkine. *Molecular Endocrinology*, 26(8), 1304–1315.
- Zhao, S., Wang, H., Nie, Y., Mi, Q., Chen, X., & Hou, Y. (2012). Midkine upregulates MICA/B expression in human gastric cancer cells and decreases natural killer cell cytotoxicity.

- Cancer Immunology, Immunotherapy*, 61(10), 1745–1753.
- Zhao, Y., Huang, Q., Yang, J., Lou, M., Wang, A., Dong, J., ... Zhang, T. (2010). Autophagy impairment inhibits differentiation of glioma stem/progenitor cells. *Brain Research*, 1313, 250–258.
- Zhao, Z.-Q., Yang, S., & Lu, H.-S. (2011). Expression of midkine and vascular endothelial growth factor in gastric cancer and the association of high levels with poor prognosis and survival. *Molecular Medicine Reports*, 5(2), 415–419.
- Zhou, J., Su, P., Wang, L., Chen, J., Zimmermann, M., Genbacev, O., ... Wang, F. (2009). mTOR supports long-term self-renewal and suppresses mesoderm and endoderm activities of human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(19), 7840–7845.
- Zhu, H., Acquaviva, J., Ramachandran, P., Boskovitz, A., Woolfenden, S., Pfannl, R., ... Charest, A. (2009). Oncogenic EGFR signaling cooperates with loss of tumor suppressor gene functions in gliomagenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(8), 2712–2716.
- Zhu, L. X., Sharma, S., Stolina, M., Gardner, B., Roth, M. D., Tashkin, D. P., & Dubinett, S. M. (2000). Delta-9-tetrahydrocannabinol inhibits antitumor immunity by a CB2 receptor-mediated, cytokine-dependent pathway. *Journal of Immunology*, 165(1), 373–380.
- Zhu, W.-W., Guo, J.-J., Guo, L., Jia, H.-L., Zhu, M., Zhang, J.-B., ... Ye, Q.-H. (2013). Evaluation of Midkine as a Diagnostic Serum Biomarker in Hepatocellular Carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 19(14), 3944–3954.
- Zhuang, W., Li, B., Long, L., Chen, L., Huang, Q., & Liang, Z. (2011). Induction of autophagy promotes differentiation of glioma-initiating cells and their radiosensitivity. *International Journal of Cancer*, 129(11), 2720–2731.
- Zou, H. Y., Friboulet, L., Kodack, D. P., Engstrom, L. D., Li, Q., West, M., ... Smeal, T. (2015a). PF-06463922, an ALK/ROS1 Inhibitor, Overcomes Resistance to First and Second Generation ALK Inhibitors in Preclinical Models. *Cancer Cell*, 28(1), 70–81.
- Zou, H. Y., Li, Q., Engstrom, L. D., West, M., Appleman, V., Wong, K. A., ... Fantin, V. R. (2015b). PF-06463922 is a potent and selective next-generation ROS1/ALK inhibitor capable of blocking crizotinib-resistant ROS1 mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(11), 3493–3498.
- Zou, P., Muramatsu, H., Miyata, T., & Muramatsu, T. (2006). Midkine, a heparin-binding growth factor, is expressed in neural precursor cells and promotes their growth. *Journal of Neurochemistry*, 99(6), 1470–1479.

ANEXO I: ESTADÍSTICA LDA

- Figura R4C:

Grupo 1	Grupo 2	Chisq	DF	Pr(>Chisq)
VEH	THC:CBD (1:1)	2,71	1	0,0995
VEH	THC:CBD (1:5)	19,8	1	8,72E-06
VEH	TMZ	0,709	1	0,4
VEH	(1:1) + TMZ	34,4	1	4,54E-09
VEH	(1:5) + TMZ	64,1	1	1,20E-15
THC:CBD (1:1)	THC:CBD (1:5)	7,87	1	0,00502
THC:CBD (1:1)	(1:1) + TMZ	18,4	1	1,81E-05
THC:CBD (1:5)	(1:5) + TMZ	15,8	1	7,06E-05
TMZ	(1:1) + TMZ	27,8	1	1,36E-07
TMZ	(1:5) + TMZ	56	1	7,05E-14
(1:1) + TMZ	(1:5) + TMZ	5,65	1	0,0174

- Figura R4D:

Grupo 1	Grupo 2	Chisq	DF	Pr(>Chisq)
VEH	THC:CBD (1:1)	6,38	1	0,0145
VEH	THC:CBD (1:5)	10,2	1	0,00139
VEH	TMZ	0,824	1	0,364
VEH	(1:1) + TMZ	8,76	1	0,0031
VEH	(1:5) + TMZ	14,2	1	0,00016
THC:CBD (1:1)	THC:CBD (1:5)	1,40	1	0,236
THC:CBD (1:1)	(1:1) + TMZ	1,72	1	0,189
THC:CBD (1:5)	(1:5) + TMZ	0,731	1	0,393
TMZ	(1:1) + TMZ	5,72	1	0,00967
TMZ	(1:5) + TMZ	9,04	1	0,00264
(1:1) + TMZ	(1:5) + TMZ	0,31	1	0,578

- Figura R21B-D:

Grupo 1	Grupo 2	Chisq	DF	Pr(>Chisq)
VEH Cont	SOX9	0,498	1	0,48
VEH Cont	MDK Ab Cont	16,6	1	4,53e-05
VEH Cont	MDK Ab SOX9	3,32	1	0,0683
SOX9	MDK Ab SOX9	1,28	1	0,257
MDK Ab Cont	MDK Ab SOX9	5,57	1	0,0183

Grupo 1	Grupo 2	Chisq	DF	Pr(>Chisq)
Control	SOX9	0,029	1	0,865
Control	shMDK	5,32	1	0,0211
Control	shMDK SOX9	0,106	1	0,745
SOX9	shMDK SOX9	0,0242	1	0,876
shMDK	shMDK SOX9	4,1	1	0,043

- Figura R24C:

Grupo 1	Grupo 2	Chisq	DF	Pr(>Chisq)
VEH	VEH shATG5	0,58	1	0,446
VEH	CRIZO	21,9	1	2,91e-06
VEH	CRIZO shATG5	0,155	1	0,694
shATG5	CRIZO shATG5	0,131	1	0,717
CRIZO	CRIZO shATG5	18,2	1	1,96e-05

- Figura R24D:

Grupo 1	Grupo 2	Chisq	DF	Pr(>Chisq)
VEH shC	VEH shATG7	5,82	1	0,0158
VEH shC	MDKab shC	26,2	1	3,14e-07
VEH shC	MDKab shATG7	4,71	1	0,0300
VEH shATG7	MDKab shATG7	0,056	1	0,813
MDKab shC	MDKab shATG7	10,2	1	0,00139

- Figura R29D:

Grupo 1	Grupo 2	Chisq	DF	Pr(>Chisq)
VEH	THC	0,771	1	0,38
VEH	IP10	39,9	1	2,67E-10
VEH	COMB	64,4	1	1,01E-15
IP10	COMB	4,58	1	0,0324
THC	COMB	49,5	1	2,03E-12

Grupo 1	Grupo 2	Chisq	DF	Pr(>Chisq)
VEH	VEH shATG5	0,58	1	0,446
VEH	MDK Ab	7,35	1	0,00672
VEH	MDK Ab shATG5	0,0198	1	0,888
shATG5	MDK Ab shATG5	0,407	1	0,524
MDK Ab	MDK Ab shATG5	6,93	1	0,00847

Grupo 1	Grupo 2	Chisq	DF	Pr(>Chisq)
VEH shC	VEH shATG7	5,82	1	0,0158
VEH shC	CRIZO shC	43,9	1	3,47e-11
VEH shC	CRIZO shATG7	3,92	1	0,0479
VEH shATG7	CRIZO shATG7	0,207	1	0,649
CRIZO shC	CRIZO shATG7	25,6	1	4,23e-07

Grupo 1	Grupo 2	Chisq	DF	Pr(>Chisq)
VEH	IP14	15,6	1	7,91e-05
VEH	THC	13	1	0,000307
VEH	IP14 + THC	17,9	1	2,32e-05
IP14	IP14 + THC	0,117	1	0,732
THC	IP14 + THC	0,674	1	0,412

- Figura R30A-B:

Grupo 1	Grupo 2	Chisq	DF	Pr(>Chisq)
VEH	THC:CBD	9,3	1	0,00228
VEH	MDK Ab	21,5	1	3,5e-06
VEH	COMB	62,8	1	2,29e-15
MDK Ab.	COMB	13,2	1	0,000287
THC:CBD	COMB	27,3	1	1,75e-07

- Figura 31C:

GH2				
Grupo 1	Grupo 2	Chisq	DF	Pr(>Chisq)
VEH	THC:CBD	9,68	1	0,00187
VEH	CRIZO	26,3	1	2,85e-07
VEH	COMB	63,7	1	1,42e-15
CRIZO	COMB	10,3	1	0,00133
THC:CBD	COMB	27,9	1	1,29e-07

HCO1

Grupo 1	Grupo 2	Chisq	DF	Pr(>Chisq)
VEH	THC:CBD	9,3	1	0,0034
VEH	CRIZO	27,3	1	2,37e-07
VEH	COMB	74,5	1	8,88e-18
CRIZO	COMB	9,2	1	0,011
THC:CBD	COMB	23,4	1	1,48e-06

12O12

Grupo 1	Grupo 2	Chisq	DF	Pr(>Chisq)
VEH	THC:CBD	7,72	1	0,00546
VEH	MDK Ab.	20,8	1	5,18e-06
VEH	COMB	71	1	3,59e-17
MDK Ab.	COMB	20,4	1	6,39e-06
THC:CBD	COMB	36,8	1	1,33e-09

Grupo 1	Grupo 2	Chisq	DF	Pr(>Chisq)
VEH	THC:CBD	7,72	1	0,00546
VEH	CRIZO	26,9	1	2,14e-07
VEH	COMB	71	1	3,59e-17
CRIZO	COMB	16,0	1	6,27e-05
THC:CBD	COMB	36,8	1	1,33e-09

- Figura R33E:

Grupo 1	Grupo 2	Chisq	DF	Pr(>Chisq)
VEH shC	VEH shATG5	1,3	1	0,253
VEH shC	MDKab+THC	14,3	1	0,000156
VEH shC	MKab+THC shATG5	2,34	1	0,126
MDKab+THC	MDKab+THC shATG5	5,45	1	0,0196
VEH shATG5	MDKab+THC shATG5	0,155	1	0,694

Grupo 1	Grupo 2	Chisq	DF	Pr(>Chisq)
VEH shC	VEH shATG5	0,706	1	0,401
VEH shC	CRIZO + THC	63,8	1	1,35e-15
VEH shC	CRIZO + THC shATG5	2,71	1	0,1
CRIZO + THC	CRIZO + THC shATG5	46,5	1	9,14e-12
VEH shATG5	CRIZO + THC shATG5	0,609	1	0,435

- Figura R33F:

Grupo 1	Grupo 2	Chisq	DF	Pr(>Chisq)
VEH shC	VEH shATG7	0,556	1	0,456
VEH shC	MDKab + THC shC	36,6	1	1,43e-09
VEH shC	MDKab + THC shATG7	0,175	1	0,676
MKab + THC shC	MDKab + THC shATG7	31,0	1	2,64e-08
VEH shATG7	MKab + THC shATG7	0,102	1	0,75

Grupo 1	Grupo 2	Chisq	DF	Pr(>Chisq)
VEH shC	VEH shATG7	0,556	1	0,456
VEH shC	CRIZO + THC shC	43,6	1	4,04e-11
VEH shC	CRIZO + THC shATG7	1,78	1	0,182
CRIZO + THC shC	CRIZO + THC shATG7	28,3	1	1,04e-07
VEH shATG7	CRIZO + THC shATG7	0,333	1	0,564

- Figura R35A-B:

Grupo 1	Grupo 2	Chisq	DF	Pr(>Chisq)
VEH	CRIZO	10,4	1	0,00126
VEH	TMZ	3,51	1	0,061
VEH	COMB	61,7	1	3,95E-15
CRIZO	COMB	24,2	1	8,48E-07
TMZ	COMB	88,9	1	4,21E-21

Grupo 1	Grupo 2	Chisq	DF	Pr(>Chisq)
VEH	CRIZO	28,9	1	7,64E-08
VEH	TMZ	0,139	1	0,71
VEH	COMB	54,3	1	1,68E-13
CRIZO	COMB	5,47	1	0,0193
TMZ	COMB	50,1	1	1,44E-12

Figura A1. Resumen estadística LDAs

Compilación de tablas en las que se realiza la comparación estadística (chi-cuadrado) entre los distintos grupos analizados en ensayos de LDA, con su correspondiente referencias a la figura de la que proceden. Chiq: Prueba chi-cuadrado (χ^2); DF: *degree freedom* (grados de libertad del análisis estadístico); CRIZO: Crizotinib.

ANEXO II: PUBLICACIONES

- Armstrong, J. L., Hill, D. S., McKee, C. S., Hernandez-Tiedra, S., Lorente, M., **Lopez-Valero, I.**, Eleni Anagnostu, M., Babatunde, F., Corazzari, M., Redfern CPF., Velasco, G. & Lovat, P. E. (2015). Exploiting cannabinoid-induced cytotoxic autophagy to drive melanoma cell death. *Journal of Investigative Dermatology*, 135(6), 1629–1637.
- Salazar, M., Lorente, M., García-Taboada, E., Pérez Gómez, E., Dávila, D., Zúñiga-García, P., Flores, JM., Rodríguez, A., Hegedus, Z., Mosén-Ansorena, D., Aransay, A.M., Hernández-Tiedra, S., **López-Valero, I.**, Quintanilla, M., Sánchez, C., Iovanna, J.L., Dusetti, N., Guzmán, M., Francis, S.E., Carracedo, A., Kiss-Toth, E. & Velasco, G. (2015). Loss of Tribbles pseudokinase-3 promotes Akt-driven tumorigenesis via FOXO inactivation. *Cell Death and Differentiation*, 22(1), 131–144.
- Salazar, M., Lorente, M., García-Taboada, E., Pérez Gómez, E., Dávila, D., Zúñiga-García, P., Flores, JM., Rodríguez, A., Hegedus, Z., Mosén-Ansorena, D., Aransay, A.M., Hernández-Tiedra, S., **López-Valero, I.**, Quintanilla, M., Sánchez, C., Iovanna, J.L., Dusetti, N., Guzmán, M., Francis, S.E., Carracedo, A., Kiss-Toth, E. & Velasco, G. (2015). TRIB3 suppresses tumorigenesis by controlling mTORC2/AKT/FOXO signaling. *Molecular & Cellular Oncology*, 2(3), e980134.
- Hernández-Tiedra, S., Fabriàs, G., Dávila, D., Salanueva, I.J., Casas, J., Montes L.R., Antón, Z., García-Taboada, E., Salazar, M., Lorente, M., Nylandsted, J., Armstrong, J., **López-Valero, I.**, McKee, C.S., Serrano-Puebla, A., García-López, R., González-Martínez, J., Abad J.L., Hanada, K., Boya, P., Goñi, F., Guzmán, M., Lovat, P., Jäättelä, M., Alonso, A. & Velasco, G. (2016). Dihydroceramide accumulation mediates cytotoxic autophagy of cancer cells via autolysosome destabilization. *Autophagy*, 12(11), 2213–2229.
- López-Valero, I.**, Saiz-Ladera, C., Torres, S., Hernández-Tiedra, S., García-Taboada, E., Rodríguez-Fornés, F., Barba, M., Dávila, D., Salvador-Tormo, N., Guzmán, M., Sepúlveda, J.M., Sánchez-Gómez, P., Lorente, M. & Velasco, G. (2018). Targeting Glioma Initiating Cells with A combined therapy of cannabinoids and temozolomide. *Biochemical Pharmacology*, 157, 266–274.
- López-Valero, I.***, Torres, S.*, Salazar-Roa, M., García-Taboada, E., Hernández-Tiedra, S., Guzmán, M., Sepúlveda, J.M., Velasco, G. & Lorente, M. (2018). Optimization of a preclinical therapy of cannabinoids in combination with temozolomide against glioma. *Biochemical Pharmacology*, 157, 275–284.

* Ambos autores contribuyeron igualmente al trabajo